



**EXPOSITIONS GESTATIONNELLES ET POSTNATALES A LA
GENISTEINE ET A LA VINCLOZOLINE, SEULES ET EN
ASSOCIATION, A DES DOSES COMPATIBLES AVEC L'EXPOSITION
ALIMENTAIRE HUMAINE CHEZ LE RONGEUR: EFFETS A
DIFFERENTS STADES DU DEVELOPPEMENT, IDENTIFICATION
DES MECANISMES D'ACTION AU NIVEAU
DE PLUSIEURS TISSUS ET ORGANES CIBLE,
DEVENIR DES SUBSTANCES DANS L'ORGANISME**

GESTATIONAL AND POSTNATAL EXPOSURES TO DIETARY LOW
DOSES OF GENISTEIN AND/OR VINCLOZOLIN IN RODENTS: EFFECTS
AT DIFFERENT DEVELOPMENTAL STEPS, MODES OF ACTION,
COMPOUNDS FATE AND BIOTRANSFORMATION
IN VARIOUS ORGANS AND TISSUES

Programme PNRPE
Rapport de fin de contrat

Service de Biologie de la Reproduction,
Hôpital Cochin, 75014 Paris

Jacques Auger,
Tel: 33 1 58 41 15 67
Fax: 33 1 58 41 15 65
e-mail: jacques.auger@cch.aphp.fr

Date : 12/07/09

N° de contrat : CV05000147
Date du contrat : 23/01/06

TABLE DES MATIERES

- Remarques concernant ce document	4
- Synthèse	5
- Résumés	13
- Rapport scientifique	15
- Annexe : tirés à part des publications	30
- Annexe : partie confidentielle	45

REMARQUES CONCERNANT CE DOCUMENT

- ❖ La mise en forme de ce rapport, hormis sa partie scientifique et les annexes, doit être respectée. Ce format imposé permettra au SRP une copie automatique vers d'autres documents à usage interne ou externe.
- ❖ Merci de limiter la taille de votre document à 5Mo.
- ❖ Votre rapport doit nous parvenir sous forme électronique sur CD ainsi que sous format papier en 5 exemplaires au moins pour le responsable du programme et en 1 exemplaire pour son animateur scientifique, en recto-verso, interligne simple, sans couverture plastique ni spirales. Des exemplaires supplémentaires, à la charge du ou des bénéficiaire(s), seront éventuellement demandés (art. 4 de la convention).
- ❖ Les versions électroniques des résumés et de la synthèse de votre rapport doivent impérativement nous parvenir sous format modifiable rtf afin de pouvoir être réutilisés pour valorisation ou publiés (après relecture de votre part), ainsi que sous format pdf (art. 4 de la convention).
- ❖ Les documents de ce rapport, en dehors de l'éventuelle partie confidentielle, serviront aussi bien pour l'évaluation du projet que pour la valorisation des résultats.

SYNTHESE

(destinée aux utilisateurs et gestionnaires publics)

Expositions gestationnelles et postnatales à la génistéine et à la vinclozoline, seules et en association, à des doses compatibles avec l'exposition alimentaire humaine chez le rongeur: effets à différents stades du développement, identification des mécanismes d'action au niveau de plusieurs tissus et organes cible, devenir des substances dans l'organisme.

PROGRAMME PNRPE2005

Responsable scientifique : - Jacques AUGER

Partenaires scientifiques : - Marie Chantal CANIVENC-LAVIER

- Martine PERROT-APPLANAT

- René HABERT

- Jean François SAVOURET

- Jean Pierre CRAVEDI

En français

CONTEXTE GENERAL

Depuis plusieurs décennies, le risque pour les être vivants que pourrait comporter la présence dans l'environnement de composés chimiques issus des activités humaines fait l'objet de nombreuses actions de recherche soutenues par des institutions internationales et nationales. Plus récemment, l'attention s'est portée sur de nombreux composés chimiques - dénommés xénohormones ou perturbateurs endocriniens (PE) - susceptibles de mimer l'action des hormones en produisant des effets activateurs ou inhibiteurs mais aussi pouvant interférer avec le système hormonal en altérant le transport, la synthèse ou la dégradation des hormones. L'état des connaissances sur l'impact tissulaire et moléculaire des PE a beaucoup progressé au cours des dix dernières années grâce à des modèles *in vitro* faisant appel à la biologie cellulaire et moléculaire, et à des approches d'écotoxicologie. Dans de nombreuses études expérimentales, le plus souvent chez le rongeur, plusieurs PE se sont révélés agir sur les tissus et organes de la reproduction notamment mâle du fait de leurs propriétés oestrogéniques (féminisantes) ou antiandrogéniques (démasculinisantes). Il faut cependant noter que ces travaux se fondent sur des conditions très éloignées de l'exposition humaine (études *in vitro* ou *in vivo* mais alors un seul composé testé, à dose élevée dans des fenêtres d'exposition limitées, pendant la gestation, en néonatal, etc...). Par ailleurs, et au cours des vingt dernières années, il a été observé des modifications de la reproduction mâle dans plusieurs espèces, y compris l'homme (augmentation de la fréquence des cancers du testicule, anomalies du développement de l'appareil génital, baisse de la qualité du sperme,...) faisant suspecter le possible rôle des PE.

L'évaluation du risque des PE pour la santé de l'homme reste un domaine encore peu étudié du fait de la difficulté de caractériser des expositions multiples et complexes, et d'évaluer leur impact sans approche invasive. Rares sont les études chez l'homme établissant un lien entre exposition aux PE et anomalies de la santé. Aussi les organismes institutionnels ont proposé au cours des cinq dernières années que soient développés des projets plus orientés vers des conditions d'exposition réalistes (effets chroniques à faibles doses, multi-expositions, ...) et l'évaluation du risque pour l'homme. Il est en effet fondamental et urgent de mieux évaluer l'impact des PE à court, moyen et long terme sur le développement, la santé et le comportement des individus. Il est tout aussi important de préciser les possibles mécanismes d'action, faisant si nécessaire la part entre risques liés à des contaminants chimiques (pesticide, migrant d'emballage, polluant) et ceux liés à des molécules naturelles (phyto-oestrogènes par exemple) auxquelles les hommes sont aussi exposés *via* leur alimentation.

Dans cette perspective, même si aucun modèle expérimental ne peut réunir les conditions d'exposition humaine aux PE (notamment par rapport aux sources multiples et aux voies d'exposition multiples), nous avons développé un modèle original dans le but de tester plusieurs conditions d'exposition se rapprochant des conditions d'exposition alimentaires humaines. Deux PE, un phyto-oestrogène, la génistéine, présent dans l'alimentation (soja, pois, etc...) et un fongicide antiandrogénique, la vinclozoline*, contaminant alimentaire avéré, ont été administrés par gavage, seuls ou en association, de la conception à l'âge adulte chez le rat, soit à des doses faibles inférieures à celles réputées sans effet, c'est à dire proches des conditions d'exposition environnementale, soit à des doses plus élevées proches des conditions d'exposition de type pharmacologique ou toxicologique.

Ce modèle a permis d'étudier les conséquences sur la fonction de reproduction et la fertilité des animaux mâles exposés. C'est pour les rats ayant été exposés à la combinaison génistéine + vinclozoline à faible dose que le plus d'effets néfastes pour la reproduction a été observé. Il s'agissait principalement d'un retard de développement du pénis, d'anomalies macroscopiques et microscopiques de la voie génitale, d'altérations qualitatives et quantitatives des spermatozoïdes, et d'une diminution de plusieurs indices de fertilité.

* Il est à noter que la vinclozoline notamment du fait de sa très large utilisation en agriculture et viticulture et des risques potentiels pour la santé humaine a récemment été interdite en France (retrait d'autorisation de mise sur le marché au 1 janvier 2007 et date limite d'utilisation fixée au 31 décembre 2007; J.O. n° 71 du 24 mars 2007). Il n'en reste pas moins que cette molécule demeure autorisée dans de nombreux pays et que la contamination au travers de produits importés est toujours possible.

OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

Les objectifs généraux du programme proposé dans le cadre du PNRPE2005 s'appuyaient sur les données de la littérature récente et les résultats originaux acquis dans la pré-étude brièvement rapportés ci-dessus, indiquant de possibles effets négatifs des PE lors d'expositions *in vivo* à faibles doses :

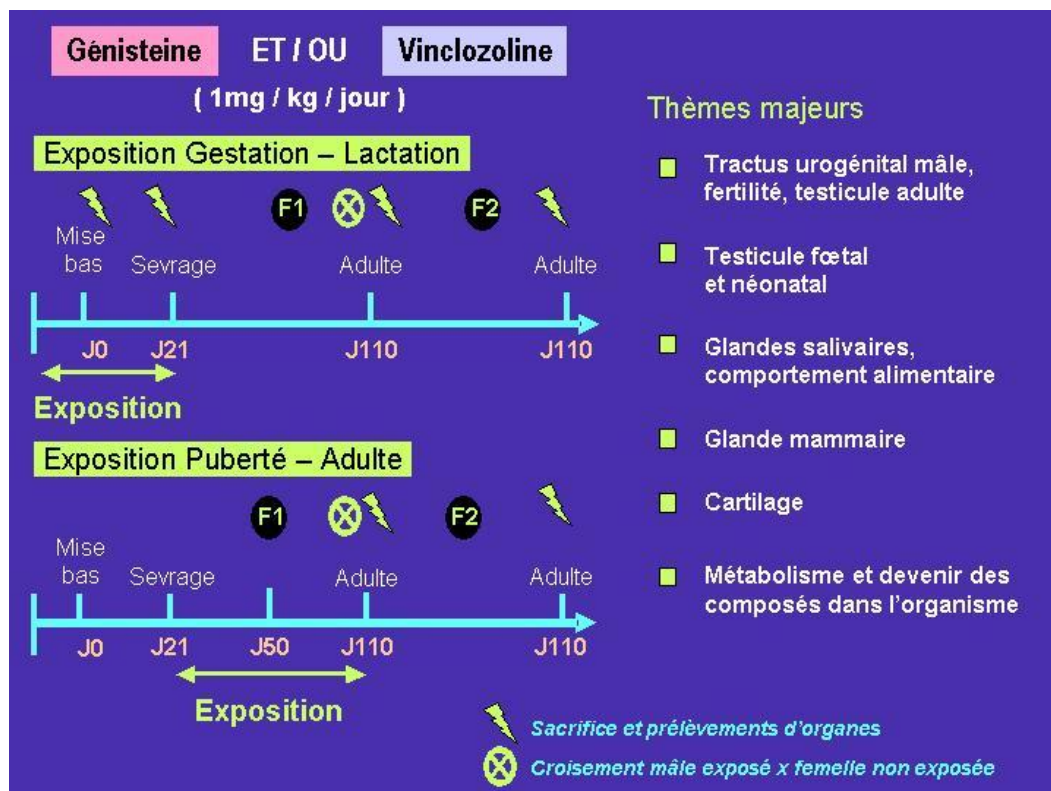
- Déterminer les impacts d'un mélange à faibles doses de génistéine et de vinclozoline sur divers tissus et organes régulés par les androgènes et/ou oestrogènes (appareil reproducteur, mais aussi, cartilage, glandes salivaires, glande mammaire),
- Etudier la part respective des expositions gestationnelles/ lactationnelles et adultes dans les effets observés chez l'adulte,
- Evaluer si les expositions à doses faibles chez le père ont un impact dans la descendance (en première génération),
- Tenter de préciser les mécanismes en cause,
- Compléter les données sur le devenir dans l'organisme et les concentrations tissulaires des molécules et/ou de leurs métabolites, notamment lorsque vinclozoline et génistéine sont associées.

QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)

Le programme proposé reposait principalement sur une exposition aux deux composés, isolément ou en association (1mg/kg/jour, par voie orale) permettant d'étudier les organes et tissus choisis à des temps variés du développement selon deux modalités d'exposition comme dans la **Figure 1** ci-dessous.

Figure 1. Protocole principal d'exposition chez le rat.

F1 = première génération exposée ; F2 : deuxième génération non exposée issue de pères exposés



En relation avec la question actuellement débattue de possibles effets transgénération après exposition à des perturbateurs endocriniens, le programme prévoyait de rechercher de tels effets dans la génération F2 non exposée issue de mâles exposés.

Dans le but de mieux comprendre les possibles mécanismes d'action, le programme se fondait sur l'utilisation de divers modèles expérimentaux complémentaires : souris invalidée pour les récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes, approches variées *in vitro*, approches « omiques » (moléculaires) et étude du devenir des molécules dans l'organisme.

Le programme prévoyait également une exposition cette fois-ci continue, de la conception à l'âge adulte avec des doses environnementales, c'est à dire des doses encore plus faibles très similaires aux doses d'exposition humaines, pour étudier les mêmes tissus, organes et fonctions chez le rat.

Malheureusement la complexité de ce protocole se poursuivant sur de nombreux mois du fait de l'élevage de deux nouvelles générations allié à des difficultés organisationnelles et des retards dans les financements n'ont pas permis de réaliser cette deuxième exposition qui sera cependant faite de manière élargie dans le cadre du programme CIME (PNRPE 2008) débutant fin 2009 compte tenu des résultats du présent programme.

RESULTATS OBTENUS

Nous rapportons ci-dessous les résultats principaux pour chacun des tissus, organes, fonctions étudiés. Une sélection de quelques uns des résultats les plus marquants est présentée à la fin dans la **Figure 2**.

Appareil génital mâle en période fœtale, néonatale et conséquences à l'âge adulte

- Seuls les nouveaux-nés ayant été exposés durant la gestation à la vinclozoline présentent une réduction significative du nombre de gonocytes (cellules germinales primordiales) mais probablement transitoire car lors de l'exposition gestation/lactation, la production de spermatozoïdes à l'âge adulte n'est pas modifiée. De manière intéressante, l'effet de la vinclozoline n'est plus retrouvé en présence de génistéine. L'effet « positif » de la génistéine associée à la vinclozoline sur le nombre de gonocytes en période néonatale semble se négativer si l'exposition au mélange est maintenue jusqu'à l'âge adulte (pré-étude): dans ce cas, la production de spermatozoïdes est réduite environ de moitié. Ce résultat suggère des mécanismes d'action différents de la génistéine sur le testicule en pré et postnatal.
- Etudiant *in vitro* les effets de la génistéine sur la sécrétion de testostérone et le nombre de gonocytes grâce à un système de culture de testicules fœtaux de souris à différents stades du développement, il a été trouvé que la génistéine induit une diminution de la sécrétion de testostérone de façon temps et dose dépendante dans les testicules de 12,5 jours après la conception en relation avec une diminution de l'expression des principaux gènes impliqués dans la synthèse de testostérone. Cet effet n'est pas retrouvé sur des testicules prélevés 18,5 jours après la conception. Dans ce même modèle, aucun effet de la génistéine sur le nombre de gonocytes n'est observé, ce résultat allant dans le même sens que les données *in vivo* en néo-natal.
- L'étude des possibles mécanismes d'action de la génistéine sur le testicule fœtal grâce à des testicules de souris invalidées pour les récepteurs aux oestrogènes alpha ou bêta montre que l'inhibition de la synthèse de testostérone induite par la génistéine passe par le récepteur aux oestrogènes alpha.
- Utilisant des approches variées, plusieurs spécificités majeures de l'action des androgènes dans le testicule fœtal ont été identifiées: 1) les androgènes ont un effet négatif sur la prolifération des cellules germinales fœtales, 2) le récepteur des androgènes est localisé dans les cellules germinales mais non dans les cellules de Sertoli pendant la vie fœtale (l'inverse est observé chez l'adulte).
- Seule une minorité d'animaux exposés pendant la gestation/lactation soit à la génistéine soit à la vinclozoline présentent des anomalies du développement de l'appareil urogénital, principalement des testicules non descendus suggérant l'absence de modification importante de la balance hormonale cruciale pour le développement de la voie génitale et des mécanismes complexes présidant à la descente testiculaire. En revanche, pendant la même période, une exposition aux

deux molécules induit des anomalies du développement urogénital dans un tiers des cas suggérant une synergie d'effets. Malheureusement, les analyses *in vivo* en néonatal ou *in vitro* n'ont pas permis de dégager des pistes sur les mécanismes d'action possiblement en œuvre lors de l'exposition combinée.

Expositions pendant la gestation/lactation, conséquences sur la puberté chez le mâle

- La puberté est significativement retardée dans les trois groupes d'exposition, le retard étant significatif avec la vinclozoline et la génistéine associée à la vinclozoline.
- Lors de la lactation, les rats continuent à être exposés *via* le lait. En effet, il a été montré dans ce programme que la vinclozoline et/ou ses métabolites sont éliminés par le lait. La vinclozoline n'est pas retrouvée en tant que telle, en revanche, ses métabolites, M1 et M2, actifs en matière de perturbation endocrinienne, sont retrouvés dans le lait et dans les échantillons de sang. M2 est le métabolite principal dans le lait, M1 est le métabolite principal dans le sang. Le profil des résidus dans le sang des rats est similaire à celui des mères et différent de celui du lait. Les concentrations en M1 et M2 semblent différentes en fonction de l'exposition des mères (vinclozoline seule ou associée avec de la génistéine). Les concentrations en génistéine du sang des mères et du lait sont relativement faibles, en conséquence, les concentrations en génistéine du sang des rats sont basses.

Effets différentiels des expositions pendant la gestation/lactation ou de la puberté à l'âge adulte sur l'appareil génital mâle adulte et la fertilité

- Les altérations de l'appareil reproducteur et de la fertilité observées chez l'adulte sont en comparaison beaucoup plus modestes pour les expositions gestation/lactation et puberté/adulte comparées à ce qui a été trouvé pour l'exposition continue de la conception à l'âge adulte (pré-étude).
- L'exposition gestation/lactation augmente la fréquence des pertes post-implantatoires chez les femelles témoin croisées avec des mâles exposés à la génistéine seule ou associée à la vinclozoline. L'exposition puberté/adulte diminue les poids épидидymaires pour les trois modalités d'exposition et la production de spermatozoïdes pour la génistéine et la vinclozoline mais pas l'association.

Ainsi il semblerait que lors d'une exposition à faibles doses à la génistéine et/ou à la vinclozoline, ce soit une « imprégnation » permanente affectant tous les stades du développement qui provoque le plus d'anomalies de la reproduction chez l'adulte. Dans ces conditions, les effets phénotypiques maximum sont observés pour le mélange des composés.

Ce travail a aussi été l'occasion de disposer de données de base sur les modifications du transcriptome testiculaire (étude des ARN messagers) et du protéome (étude des protéines) des spermatozoïdes épидидymaires après une exposition continue de la conception à l'âge adulte à diverses doses de génistéine et de vinclozoline et à leurs associations grâce au matériel conservé de la pré-étude.

Des modifications des profils d'expression des ARN messagers testiculaires ont été trouvées pour les différentes modalités d'exposition. Il existait une bonne corrélation entre l'étendue des effets observés et le nombre de gènes modifiés selon les différentes expositions. Les gènes induits appartenaient à la famille de gènes impliqués dans les interactions neuroactive ligand-récepteur en liaison avec des facteurs hormonaux (par exemple FSH/FSHR, PPAR et leurs récepteurs). Toutes les modalités d'exposition diminuaient les niveaux des ARN messagers impliqués dans la fonction ribosomale indiquant une possible réduction globale des synthèses protéiques.

Compte tenu de son coût, l'évaluation des possibles modifications des protéines des spermatozoïdes a été limitée à une exposition à dose intermédiaire de vinclozoline (30mg/kg/jour). Ainsi, l'exposition continue à ce composé de la conception à l'âge adulte modifie l'expression d'un certain nombre de

protéines du spermatozoïde notamment des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique du spermatozoïde, des protéines impliquées dans la mobilité et dans la capacitation des spermatozoïdes (la capacitation est l'ensemble des processus complexes rendant le spermatozoïde apte à la fécondation). Ces modifications pourraient expliquer, au moins en partie, la diminution de la fertilité observée chez les rats exposés.

Effet de l'exposition pendant la gestation/lactation sur la glande mammaire

- L'exposition à la génistéine montre une augmentation de la prolifération des cellules de la glande mammaire en période pubertaire.
- L'exposition à la vinclozoline et au mélange génistéine/vinclozoline révèle des modifications de l'anatomie microscopique de la glande mammaire à la puberté; ces modifications impliquent des variations de réceptivité hormonale.

Effet de l'exposition pendant la gestation/lactation sur le cartilage

- Les premiers résultats montrent l'existence de malformations morphologiques des queues des rats induites par la vinclozoline et la génistéine aux faibles doses. Les queues sont cannelées, avec la présence de nodules au toucher, régulièrement répartis sur toute la longueur de la queue.
- Les corps vertébraux et les disques intervertébraux paraissent normaux. L'observation microscopique de préparations colorées montre la présence de tissu cartilagineux non en place sous la forme de nodules de part et d'autre des disques intervertébraux.

Ces résultats inattendus seront l'objet de travaux approfondis dans le programme CIME (PNRPE2008).

Effets différentiels des expositions pendant la gestation/lactation ou de la puberté à l'âge adulte sur le comportement alimentaire et les glandes salivaires

- Une exposition périnatale augmente les préférences au sucré chez les mâles immatures, traduisant une féminisation du comportement alimentaire. Cet effet disparaît à l'âge adulte.
- Une exposition de la puberté à l'âge adulte induit au contraire une diminution significative des préférences au sucré, chez les mâles uniquement.
- Chez les mâles, les différentes expositions modifient l'anatomie microscopique des glandes salivaires.

Ce travail a permis d'identifier les glandes salivaires comme une cible sensible aux PE: pris dans leur ensemble, les résultats confirment que des PE, ici la génistéine et/ou la vinclozoline, peuvent affecter les préférences gustatives et que ces effets ne sont pas directement associés à une modification des taux de leptine circulants. Les effets sur les glandes salivaires semblent corrélés avec les effets sur les perceptions gustatives. Dans tous les cas, les effets sont majorés lors de l'exposition au mélange.

Effets observés en seconde génération

- Les rats de deuxième génération, mâles et femelles non exposés, descendant de pères exposés à la vinclozoline présentent aussi des queues crénelées dans tous les cas,
- Pour les trois types d'expositions, les femelles non exposées de deuxième génération issues des pères exposés ont une tendance à préférer le sucré en comparaison aux témoins,

- Enfin, des anomalies de l'appareil reproducteur mâle ont été observées en deuxième génération non exposée lorsque les pères avaient été exposés pendant la gestation/lactation mais aussi lors d'exposition des pères de la puberté à l'âge adulte avec une diminution significative de la production de spermatozoïdes pour les animaux issus de pères exposés à la vinclozoline seule ou à la vinclozoline associée à la génistéine de la puberté à l'âge adulte uniquement.

La **Figure 2** ci-dessous présente quelques uns des résultats marquants de ce programme multidisciplinaire.

Figure 2. Sélection de résultats illustrant l'impact d'expositions périnatales ou pubertaire/adulte à une faible dose de génistéine et/ou de vinclozoline sur plusieurs tissus, organes, fonction ou comportement.

Exposition gestationnelle et lactationnelle ou de la puberté à l'âge adulte à des doses faibles (1mg/kg/jour) de génistéine (G) et/ou de vinclozoline (V)

- V, G et GV lors de l'exposition périnatale ↗ les préférences au sucré chez les mâles immatures
- V, G et GV lors de l'exposition post-puberté ↘ les préférences au sucré chez les mâles adultes
- G, V et particulièrement GV modifient l'anatomie microscopique des glandes salivaires
- V ↘ le nombre de gonocytes en néonatal mais cela ne modifie pas la production de spermatozoïdes. G modifie transitoirement la synthèse de testostérone au début du développement testiculaire par l'intermédiaire des récepteurs alpha aux oestrogènes. GV induit des anomalies du développement urogénital dans 1/3 à 1/4 des cas
- V et GV retardent la puberté. L'exposition des ratons continue au cours de la lactation: les métabolites M1 et M2 de V et G sont retrouvés dans le lait et le sang des ratons
- L'exposition gestationnelle et lactationnelle à G, V et GV a un nombre limité d'effets sur l'appareil génital mâle adulte et la fertilité tout comme l'exposition de la puberté à l'âge adulte alors qu'une exposition continue de la conception à l'âge adulte a de nombreux effets négatifs sur l'appareil reproducteur et la fertilité particulièrement avec GV
- G ↗ la prolifération épithéliale de la glande mammaire en période péri-pubertaire
- V et GV modifient l'anatomie microscopique de la glande mammaire à la puberté. Ces modifications impliquent des variations de réceptivité hormonale.

Au total,

Ce programme multidisciplinaire a permis de montrer qu'en situation d'exposition alimentaire, des doses relativement faibles de génistéine et de vinclozoline - bien que non environnementales pour cette dernière - perturbent l'organisation et la fonction de plusieurs tissus et organes soumis à des régulations par les hormones stéroïdes, certains résultats comme la formation de nodules cartilagineux ectopiques ou les effets sur les glandes salivaires étant très inattendus. Il est clair que l'association des molécules module les effets tout comme la fenêtre d'exposition. Les mécanismes sous jacents sont en cours d'étude et s'avèrent particulièrement complexes. Les résultats en deuxième génération aussi indiquent que quelle que soit la fenêtre d'exposition il existe un retentissement non nul sur la descendance. L'ensemble de ces résultats de nature complexe questionne les schémas classiques de relation dose-effet linéaire qui auraient du conduire à la quasi absence d'effets compte tenu des doses utilisées. Ils questionnent également les modalités d'action de ces molécules le plus souvent considérées du seul point de vue de leurs propriétés oestrogénique

et antiandrogénique dans des modalités expérimentales pouvant être très éloignées du modèle ici développé. La littérature indique que ces molécules ont des propriétés multiples autres que celles d'être des perturbateurs endocriniens. Pour cet ensemble de raisons et du fait des caractéristiques du modèle utile pour l'évaluation du risque pour l'homme, les différents participants ont souhaité poursuivre et étendre le travail engagé dans de nouveaux programmes notamment à la recherche des modes d'action, certains encore en cours d'analyse au moment où se termine le programme.

IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES

Programme CIME (PNRPE 2008) dont les objectifs sont dans la continuité du présent programme.

POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES)

Cravedi JP et coll. Le concept de perturbation endocrinienne et la santé humaine. Médecine Science. 2007 23:198-204

Quelques références Internet :

www.ecologie.gouv.fr/Programme-National-de-Recherche.html

[www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/IntranetObject-accesParReference/ED%205008/\\$File/Visu.html](http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/IntranetObject-accesParReference/ED%205008/$File/Visu.html)

www.afsset.fr/upload/bibliotheque/771953541745249614035691288700/11_perturbateurs_systeme_endocrinien.pdf

www.afssa.fr/Documents/NUT-Ra-Phytoestrogenes.pdf

LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	
Publications scientifiques parues	4
Publications scientifiques à paraître	1
Publications scientifiques prévues	13
COLLOQUES	
Participations passées à des colloques	11
Participations futures à des colloques	
THESES	
Thèses passées	4
Thèses en cours	
ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION	
Articles de valorisation parus	
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	
AUTRES	
Précisez...	

RESUMES

En français

RESUME

½ à 1 page

Une étude préliminaire étudiant l'effet combiné ou non de la génistéine, phyto-oestrogène présent dans l'alimentation humaine, et, de la vinclozoline, fongicide aux propriétés antiandrogéniques et contaminant alimentaire reconnu, sur l'appareil génital et la fonction de reproduction du rat mâle, dans des conditions proches de l'exposition humaine (de la conception à l'âge adulte, doses réputées sans effet, 1mg/kg/j pour chaque, combinaison des deux molécules) a mis en évidence plusieurs altérations de la reproduction, notamment avec le mélange des composés. L'objectif principal du programme de recherche multidisciplinaire reprenant des schémas d'exposition similaires était l'étude des effets et possibles mécanismes d'action de ces molécules associées ou non à faibles doses au niveau de plusieurs organes et tissus cible des hormones stéroïdiennes (appareil génital mâle, glande mammaire, glandes salivaires, cartilage) selon que l'exposition concerne la gestation/lactation ou la période allant de la prépuberté à l'âge adulte. Le programme s'appuyait sur des protocoles d'exposition principaux chez le rat, des modèles expérimentaux complémentaires (rat, souris KO) et une étude du transfert et du devenir des composés notamment pendant la lactation. Des approches variées ont été utilisées, approches actuelles de la biologie cellulaire et moléculaire, bioinformatique, méthodes plus usuelles de la toxicologie de la reproduction, etc. Nous rapportons ci-dessous quelques uns des résultats les plus significatifs. L'exposition *in utero* à la vinclozoline diminue le nombre de gonocytes dans la période néonatale sans conséquence à long terme sur la production de spermatozoïdes. D'une manière générale, les expositions pendant la gestation/lactation ne retentissent pas sur la stéroïdogénèse en période néonatale. Des anomalies développementales de l'appareil reproducteur mâle, principalement des testicules non descendus, sont observées pour environ 1/3 des animaux exposés au mélange. Les petits continuent à être exposés au deux composés pendant la lactation. La vinclozoline n'est pas détectée dans le lait ou dans le sang des rats, seuls les métabolites actifs M1 et M2 de la vinclozoline sont détectés. L'exposition pendant la gestation/lactation à la vinclozoline ou au mélange retarde la puberté chez le mâle. Les trois modalités d'exposition féminisent le comportement alimentaire chez les mâles en début de puberté, modifient l'histologie et la vitesse de maturation des glandes salivaires avec un effet lié au sexe, elles perturbent sévèrement le développement pubertaire de la glande mammaire. Curieusement, il a été trouvé que l'exposition à la vinclozoline ou au mélange induisait la formation de nodules cartilagineux ectopiques paravertébraux. Un poids épидidymaire diminué et une moindre production spermatique ont été trouvés chez les mâles exposés de manière chronique à la génistéine ou à la vinclozoline à partir de la période postlactation, alors que l'anomalie de la reproduction la plus importante après une exposition gestationnelle/lactationnelle consistait en une augmentation des taux de pertes post-implantatoires lors du croisement des mâles exposés avec des femelles témoins. Enfin, des formations ectopiques paravertébrales, des anomalies du comportement alimentaire et de l'appareil génital mâle ont été observées en deuxième génération non exposée issue de pères exposés. Les premiers résultats sur les modes d'action produisant les effets rapportés indiquent des voies nombreuses et complexes dépassant les définitions de la perturbation endocrinienne, comme l'illustre par exemple les modifications trouvées du transcriptome testiculaire adulte. Le décryptage des mécanismes d'action est toujours en cours dans la plupart des équipes. En conclusion, ce programme multidisciplinaire est à notre connaissance le premier montrant de manière concomitante des altérations notables de la physiologie de plusieurs organes en réponse à une exposition à dose alimentaire de génistéine et/ou une dose faible, inférieure au NOAEL, de vinclozoline, principalement après une exposition gestationnelle et lactationnelle mais aussi avec une exposition post-lactationnelle jusqu'à l'âge adulte.

MOTS CLES

Cartilage, comportement alimentaire, faible dose, fertilité, génistéine, gestation/lactation, glande mammaire, glandes salivaires, métabolisme, multi-exposition, perturbateurs endocriniens, phytoestrogène, testicule foetal, tractus génital mâle, toxicologie, vinclozoline, xénohormones.

In English

ABSTRACT

1/2-1 page

A preliminary study in the rat investigating the male reproductive effects of an exposure to the phytoestrogen genistein and the antiandrogenic fungicide vinclozolin with a design approximating real world exposures (low doses, 1 mg/kg/day for each, dietary exposure from conception to adulthood) has indicated numerous detrimental effects of the compounds, and more markedly their mixture, on the male reproductive tract and fertility. Starting from a similar experimental design, the main objective of the present multidisciplinary project was the investigation of the effects and mechanisms of action of low-dose genistein and/or vinclozolin in several organs and tissues according to whether the exposure was gestational/lactational or from prepuberty to adulthood. The program was based on main exposure protocols in the rat (similar to the protocol used in the pilot study) and side experiments using a number of molecular, cellular or analytical approaches. We report below some of the main results. *In utero* vinclozolin exposure decreases the number of gonocytes in the neonatal period. This does not seem to result in modified sperm production. Overall, gestation/lactation exposure to genistein and/or vinclozolin does not affect the steroidogenesis in the neonatal period. Developmental anomalies of the male reproductive tract, mainly undescended testis, are observed for about 1/3 of animals exposed to the mixture. Pups continue to be exposed to both compounds during the lactation. Vinclozolin is not detected in milk or pups plasma: M1 and M2 vinclozolin metabolites are the active compounds detected. Gestation/lactation exposure to vinclozolin and to the mixture delays the male puberty onset. The three exposure modalities feminize the food behaviour of the males in the post-lactation period, alter the microscopic anatomy and the maturity of the salivary glands with a gender effect and they severely disrupt the pubertal development of the mammary gland. Intriguingly, exposure to vinclozolin or to the mixture was found to elicit ectopic chondrogenesis in the paravertebral region. A diminished epididymal weight and decreased sperm production was found in the male adults exposed to genistein or vinclozolin from the postlactation period, while the most important anomaly found in the male adults that have been exposed during the gestation/lactation period was an increased post-implantation rate after crossing with control females. Finally, several anomalies related to the cartilage, male genital tract and food behaviour have been observed in the second unexposed generation stemmed from exposed fathers. At the low doses tested the modes of action in the tissues and organs studied appear especially complex, as illustrated by the modifications of the testis transcriptome in the adult, and their deciphering is still ongoing. To our knowledge, this is the first multidisciplinary study providing evidence that low doses of genistein and/or vinclozolin, albeit not environmental for this last compound, are able to concomitantly disrupt the physiology of various organs and tissues mainly as the consequence of a gestational/lactational exposure but also after a chronic postlactational exposure.

KEY WORDS

Cartilage, endocrine disruptors, fetal testis, fertility, food behaviour, genistein, gestation/lactation, low dose, male reproductive tract, mammary gland, metabolism, multi-exposure, phyto-estrogens, salivary glands, toxicology, vinclozolin, xenohormones

RAPPORT SCIENTIFIQUE

Convention n° : MEDD CV0500147

Titre du programme: Expositions gestationnelles et postnatales à la génistéine et à la vinclozoline, seules et en association, à des doses compatibles avec l'exposition alimentaire humaine chez le rongeur: effets à différents stades du développement, identification des mécanismes d'action au niveau de plusieurs tissus et organes cible, devenir des substances dans l'organisme.

Responsable scientifique : Jacques Auger

Responsables des équipes impliquées :

Equipe 1: J. Auger, Hôpital Cochin, Paris en collaboration avec D. Vaiman, Institut Cochin, Université » Paris5, Paris : Appareil reproducteur mâle adulte et fertilité;

Equipe 2: R. Habert, CEA, Fontenay aux Roses: Testicule fœtal et néonatal;

Equipe 3: M.C. Canivenc-Lavier, INRA, Dijon: Glandes salivaires, comportement alimentaire, appareil génital femelle;

Equipe 4: M. Perrot-Applanat, INSERM-CHU St Louis-Paris : Glande mammaire/ angiogénèse, utérus;

Equipe 5 : J.F. Savouret, UMRS-747, INSERM ; UFR Biomédicale Saints Pères, U. Paris Descartes: Cartilage;

Equipe 6: J.P. Cravedi, INRA, Toulouse : Devenir des composés dans l'organisme

Organisme gestionnaire des crédits : DR INSERM, Paris5- Sainte-Anne

Organismes partenaires : APHP, Université Paris5, INSERM, INRA

Participation accordée par le PNRPE : 200000 euros TTC

Durée : 36 mois

Introduction, résumé du programme soumis

Un nombre croissant d'études utilisant des doses et des fenêtres d'exposition souvent éloignées des conditions d'exposition humaine indiquent que la génistéine, phyto-oestrogène commun dans l'alimentation humaine et la vinclozoline*, fongicide antiandrogénique, un contaminant alimentaire récurrent, exercent des effets sur le développement, l'intégrité et la fonction d'organes soumis à une régulation hormonale. Jusqu'à présent, une part importante des études concernait la glande mammaire pour la génistéine et l'appareil reproducteur mâle pour la vinclozoline, la période d'exposition *in utero* étant la plus étudiée.

Une pré-étude menée chez le rat (conditions proches de l'exposition humaine, de la conception à l'âge adulte, doses réputées sans effet, combinaison des deux molécules) a indiqué que l'association génistéine/vinclozoline occasionnait des effets délétères variés sur le développement et la fonction de reproduction mâle (Eustache et al., Andrologie 2003).

Après ce premier travail, où les effets observés sur le développement et les fonctions reproductrices mâles résultaient d'une exposition continue tout au long de la vie, il apparaissait intéressant d'étudier pour des doses similaires la part respective des périodes d'exposition allant de la gestation jusqu'à la lactation et, de la prépuberté jusqu'à l'âge adulte. D'autre part, des effets parfois importants étant trouvés pour des doses faibles, la question que nous nous sommes posée était de savoir si de telles doses étaient susceptibles de perturber d'autres tissus et organes soumis à une régulation oestrogénique et/ou androgénique, d'autant que quelques observations lors de la pré-étude nous avaient alerté (modifications du comportement social, malformations dentaires et du rachis, anomalies de l'appareil reproducteur femelle).

C'est pourquoi dans le cadre du programme soumis à l'appel d'offre PNRPE du MEDD nous avons tout d'abord proposé d'exposer des rats au cours de ces deux périodes clé pour le développement et la fonction reproductrice mâle et que nous avons aussi proposé d'étendre notre recherche à des tissus, organes et fonctions cible des hormones stéroïdiennes autres que l'appareil reproducteur et la fertilité mâle: glande mammaire, cartilage, glandes salivaires et comportement alimentaire.

De plus, et en relation avec la question actuellement débattue de possibles effets transgénérationnels après exposition à des perturbateurs endocriniens, le programme prévoyait de rechercher de tels effets dans la génération F2 non exposée issue de mâles exposés (même s'il s'agit plus là de rechercher d'éventuels effets de perturbations toxicologiques médiées par le père). Dans le but de mieux comprendre les possibles mécanismes d'action, le programme se fondait sur l'utilisation de modèles expérimentaux complémentaires, in vitro, chez la souris KO pour les récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes, et, l'étude du devenir des molécules dans l'organisme.

Enfin, les modifications phénotypiques diverses observées dans la pré-étude et jamais rapportées pour des expositions à faible dose tout au long de la vie posaient les questions de relations effet-dose possiblement non linéaires et en relation avec des mécanismes d'action complexes, notamment pour l'association génistéine/vinclozoline pouvant impliquer de multiples voies métaboliques et de signalisation avec de surcroît, de possibles mécanismes adaptatifs au fur et à mesure de l'exposition en continu.

Aussi, il nous a paru opportun de tenter de disposer de données de base issues d'approches « omiques » pour juger des impacts moléculaires des expositions prolongées et, dans l'idée de s'approcher d'une évaluation du risque pour l'homme, de proposer d'étudier les effets d'une exposition de la conception à l'âge adulte aux deux molécules et à leur association, choisissant cette fois des niveaux d'exposition encore plus faibles, voisins de ceux plausibles lors de l'exposition alimentaire humaine. Malheureusement pour des questions de logistique, cette exposition à très faibles doses en continu n'a pu être faite. Elle va être conduite dans le programme CIME (PNRPE2008; Coordinatrice : M.C. Canivenc-Lavier) faisant suite au programme présent.

** Il est à noter que la vinclozoline notamment du fait de sa très large utilisation en agriculture et viticulture et des risques potentiels pour la santé humaine a récemment été interdite en France dans le cadre du Grenelle de l'Environnement (Retrait d'AMM au 1 janvier 2007 et date limite d'utilisation fixée au 31/12/2007; J.O. n° 71 du 24 mars 2007). Il n'en reste pas moins que cette molécule demeure autorisée dans de nombreux pays et que la contamination au travers de produits importés est toujours possible.*

Résultats acquis au cours du Programme PNRPE2005

Afin de faire ressortir l'impact des différentes modalités d'exposition sur les tissus, organes ou fonctions étudiés, mais aussi le travail des différentes équipes et leurs collaborations, nous choisissons de rapporter nos résultats en fonction des périodes successives du développement.

A. Exposition gestationnelle et en période néonatale à la génistéine et/ou à la vinclozoline : effets sur la mise en place et le développement du testicule et de l'appareil reproducteur mâle, possibles mécanismes (Equipe 2 principalement et Equipe 1)

Le programme de l'Equipe 2 sous la direction de R. Habert et C. Levacher visait à étudier les effets de l'exposition à la génistéine et/ou à la vinclozoline pendant la vie *in utero* sur le développement du testicule fœtal et néonatal et à analyser les voies d'action des stéroïdes dans ce processus.

Dans la synthèse des résultats obtenus par les différentes équipes, il nous a semblé intéressant de mettre en correspondance les résultats de l'Equipe 2 avec ceux de l'Equipe 1 (J. Auger) sur le testicule adulte et la production spermatique (bien que nombre de gonocytes in situ et réserve spermatiques ne soient pas des données strictement comparables). Les résultats obtenus et les commentaires s'y rapportant sont présentés ci-après.

A.1. Effet sur le nombre de gonocytes : conséquences à l'âge adulte?

- Chez le rat nouveau-né, aucune différence morphologique n'a été observée entre les contrôles (C) et les rats exposés pour les trois modalités d'exposition,
 - Les nouveaux nés ayant été exposés durant la gestation à la vinclozoline présentaient une réduction significative (d'environ 20%) du nombre de gonocytes (**Figure 1**), l'exposition à la génistéine était sans effet et, de manière intéressante, l'effet de la vinclozoline n'était plus retrouvé lorsque la génistéine était associée à la vinclozoline.
1. L'effet de la vinclozoline sur la multiplication des gonocytes semble transitoire : lorsque l'exposition n'est pas poursuivie au delà de la lactation, on observe chez l'adulte exposé à la vinclozoline durant la gestation et la lactation une réserve spermatique non différente de celle observée chez les rats témoin (données de l'Equipe 1, voir **Tableau 1**). Le même effet transitoire est retrouvé avec la vinclozoline si l'exposition est prolongée au-delà de la lactation et jusqu'à l'âge adulte, comme le suggèrent les données de l'Equipe 1 qui indiquent des réserves spermatiques similaires chez les rats témoins et les rats exposés en continu à la vinclozoline : *ceci suggère un mécanisme adaptatif positif en relation avec la poursuite de l'exposition*,
 2. La génistéine seule à la dose utilisée semble sans effet sur la prolifération des cellules germinales en néonatal et à l'âge adulte si l'exposition concerne seulement la période gestation-lactation ou si l'exposition est maintenue jusqu'à l'âge adulte (résultats Equipe 1, **Tableau 1**),
 3. A l'âge adulte une exposition à l'association génistéine/vinclozoline au cours de la gestation/lactation semble sans effet sur la production de spermatozoïdes (résultats Equipe 1, **Tableau 1**); Par contre l'effet « positif » de la génistéine associée à la vinclozoline sur le nombre de gonocytes en période néonatale semble se négativer si l'exposition au mélange est maintenue jusqu'à l'âge adulte et si l'on en juge par la réserve spermatique réduite environ de moitié par rapport au contrôle (résultats Equipe 1, **Tableau 1**), *ce résultat suggère des mécanismes d'action différents de la génistéine sur le testicule en pré et postnatal*,
 4. Les expositions post-lactation montrent des effets encore différents sur la production spermatique puisque l'exposition à chaque composé séparément à partir de la prépuberté réduit la production spermatique alors que leur association n'a pas d'effet significatif

Figure 1. Nombre de gonocytes dans des testicules de rats nouveau-nés de 3 jours dont la mère a été exposée (ou non, C) pendant toute la gestation et en néonatal (gestation+début de lactation) à 1 mg/kg/j de génistéine (G), vinclozoline (V) ou des 2 molécules (VG). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0.05$).

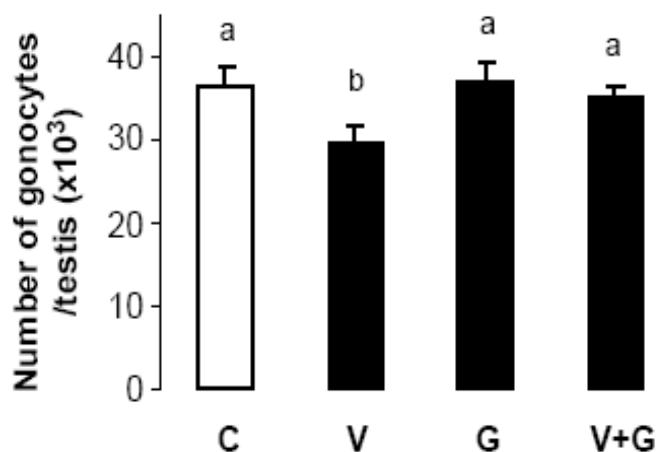


Tableau 1. Réserves spermatiques en fonction des différentes modalités d'exposition.

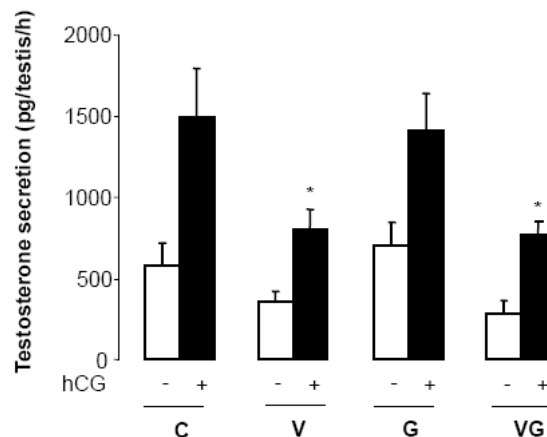
**_‡ : $p < 0,01$, *_° : $p < 0,05$

Exposure window	Epididymal sperm reserve – millions(SD)			
	C	g(1)	v(1)	g(1)+ v(1)
Gestational Lactational	119(35)	111(27)	111(21)	102(24)
Prepuberty Adult	117(29) ^{**_‡,[°]}	73(32) ^{**}	80 (43) [*]	98(44)
Gestational to Adult	104(45)	106(27)	114 (11) [‡]	58 (34) [‡]

A.2. Capacité stéroïdogène du testicule de rat 3 jours après la naissance

- Seule une faible réduction de la production de testostérone, significative uniquement en conditions stimulées par hCG (**Figure 2**), est observée chez les nouveau-nés exposés *in utero* à la vinclozoline,
- Il n'existait pas d'altérations significatives de l'expression de gènes codant pour les principales protéines impliquées dans la stéroïdogénèse (StaR, P450scc, P450C17) ni de modifications du nombre de cellules de Leydig,
- A ce stade, la génistéine ne semble pas modifier la stéroïdogénèse ni modifier les altérations induites par la vinclozoline.

Figure 2. Sécrétion *ex vivo*, en absence ou en présence d'hCG, de testostérone par des testicules de rats nouveau-nés de 3 jours dont la mère a été exposée (ou non, C) pendant toute la gestation et en néonatal (gestation+début de lactation) à 1 mg/kg de génistéine (G), de vinclozoline (V) ou des 2 molécules (VG). * $p < 0.05$ par rapport au contrôle avec le même traitement (+ hCG).



Notes

. Pour des raisons de contraintes budgétaires, les dosages hormonaux n'ont malheureusement pu être réalisés dans le présent programme ne permettant par exemple pas toute comparaison sur les possibles effets des expositions gestationnelle/lactationnelle ou pubertaire/adulte sur la sécrétion de testostérone à l'âge adulte. Cependant tous les prélèvements sanguins ont été réalisés et le dosage de la testostérone comme d'autres hormones seront réalisés ultérieurement.

. Il est à noter que lors d'une exposition continue, de la conception à l'âge adulte, à chaque composé isolément ou en association, nous n'avons observé aucune modification significative des taux de testostérone sérique chez les rats adultes. Bien que n'ayant pas réalisé une quantification des cellules de Leydig, nous n'avons pas non plus observé d'anomalies particulières au niveau de ces cellules en histologie conventionnelle.

Ainsi, et pour les faibles doses choisies, la génistéine, la vinclozoline et leur association ne semblent pas avoir un impact sur les cellules de Leydig et la production de testostérone évaluées en néonatal, et lorsque l'exposition est poursuivie jusqu'à l'âge adulte, résultat demandant à être confirmé et étudié plus amplement lorsque les modalités d'exposition diffèrent.

A.3. Caractérisation des mécanismes d'action de la vinclozoline et de la génistéine sur le développement du testicule fœtal et néonatal: implication des récepteurs des stéroïdes (Equipe 2)

A.3.1. Action *in vitro* de la génistéine

L'étude des effets *in vitro* de la génistéine sur la sécrétion de testostérone et le nombre de gonocytes a été réalisée grâce à un système de culture organotypique (cultures de 3 jours) de testicules fœtaux de souris explantés à différents stades du développement (il est important de préciser que les souris utilisées ont été élevées avec un régime alimentaire sans phyto-oestrogènes). Les résultats suivants ont été trouvés :

- La génistéine induit une diminution de la sécrétion de testostérone de façon temps et dose dépendante (**Figure 3**) dans les testicules explantés à 12,5 jpc (jours post conception). Ces effets peuvent être attribués à une diminution de l'expression des principaux gènes codant pour des protéines impliquées dans la stéroïdogénèse (**Figure 4**),

Figure 3. Effet de la génistéine à différentes concentrations sur la production de testostérone par des testicules fœtaux 12,5 jours post-conception, pendant 3 jours de culture. La sécrétion de testostérone est exprimée en pourcentage des témoins. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, (test de Student apparié).

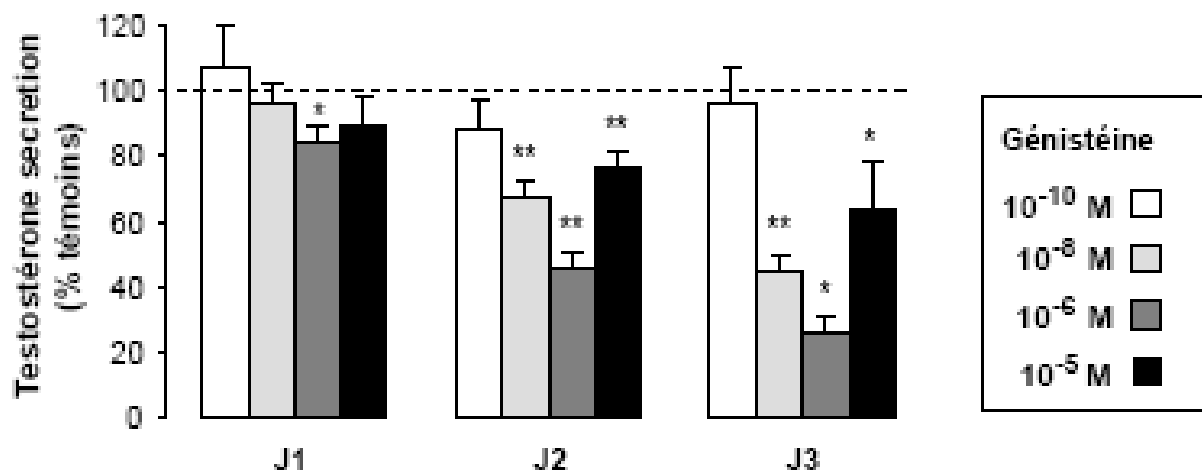
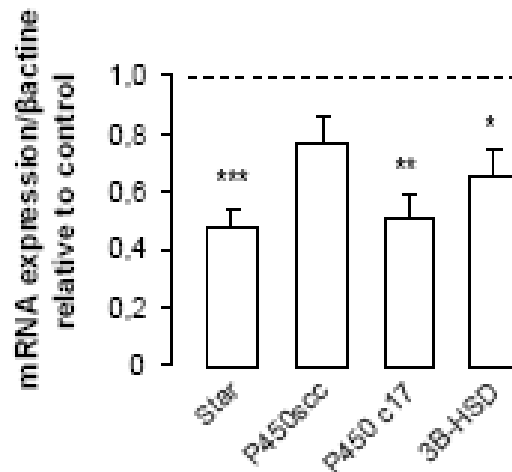


Figure 4. Analyse en PCR quantitative en temps réel de l'effet de la génistéine à 10^{-6} M sur le niveau d'ARNm de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse. Les résultats sont calculés par la méthode du delta-delta de Ct en utilisant la β actine comme référence. Les valeurs correspondent à la moyenne des valeurs relatives \pm SEM, les témoins ayant une valeur de 1. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (test t de Student apparié; $n=6$).



Les effets observés sont compatibles avec les expériences menées in vivo chez le rat dans la mesure où la dose de 10^{-8} M capable d'induire une inhibition de la stéroïdogénèse correspond à la concentration de génistéine présente dans la circulation des mères et des nouveau-nés à la suite du gavage de rates avec 1 mg/kg/j de génistéine (voir ci dessous résultats de l'Equipe 6). Cependant la génistéine ne modifiait pas significativement la stéroïdogénèse de testicules de souris à 18,5 jours post conception.

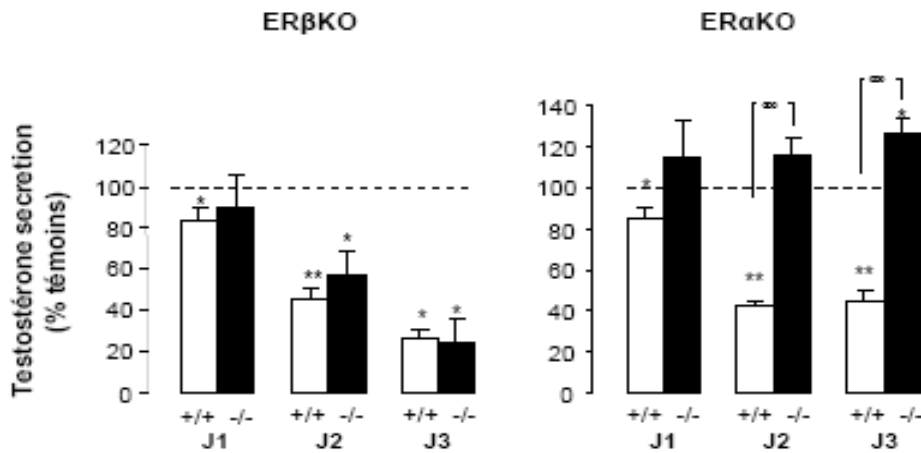
- Aucun effet de la génistéine à 10^{-6} ou 10^{-8} M sur le nombre de gonocytes dans des testicules explantés à 12,5 ou 18,5 jours post-conception et cultivés pendant 3 jours n'a été mis en évidence (résultats non présentés), ***ce résultat allant dans le même sens que les données in vivo en néonatal.***

Dans un second temps, les possibles mécanismes d'action de la génistéine sur le testicule fœtal ont été étudiés en utilisant des testicules de souris invalidées pour les récepteurs aux oestrogènes alpha ou beta (ER α KO et ER β KO) précédemment caractérisées dans l'Equipe 2 (Delbes et al Endocrinology, 2004 ; Delbes et al Endocrinology 2005).

- La génistéine induisait les mêmes altérations de la stéroïdogénèse dans les testicules de souris ER β KO et sauvages,
- En revanche, elle était sans effet sur des testicules de souris ER α KO.

Ceci montre clairement que le testicule fœtal présente une fenêtre temporelle précise de sensibilité à la génistéine, au début du développement testiculaire, et que l'inhibition de la stéroïdogénèse induite par la génistéine passe par ER α . (Figure 5).

Figure 5. Effet de la génistéine à différentes concentrations sur la production de testostérone par des testicules fœtaux de souris ER α KO ou ER β KO à 12,5 jours post-conception, pendant 3 jours de culture. La sécrétion de testostérone est exprimée en pourcentage des témoins. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$: différence statistiquement significative avec le témoin du même jour dans le test de Student en valeurs appariées. °°° : $p < 0,001$: différence statistiquement significative avec le KO et le sauvage (+/+ par rapport à -/-) du même jour (test t de Student apparié)



En conclusion, les études en parallèle sur les possibles mécanismes d'action de la vinclozoline ne démontrent aucun effet de celle-ci sur le nombre de gonocytes fœtaux. Par contre elles montrent que la génistéine est susceptible de modifier la stéroïdogénèse à des stades précoces du développement testiculaire par l'intermédiaire des ER α .

Des études *in vivo* seront nécessaires pour confirmer la réalité de ces effets lors d'expositions *in vivo*. Mais l'étude réalisée *in vivo* chez le rat nouveau-né laisse penser que l'altération précoce induite pourrait disparaître puisqu'il n'existe pas d'altération de la stéroïdogénèse chez le rat nouveau-né exposé à la génistéine pendant la vie fœtale et néonatale. Il faut cependant préciser que les effets observés chez le rat ne sont pas obligatoirement transposables à la souris, notamment en ce qui concerne l'effet des perturbateurs endocriniens sur la stéroïdogénèse (Lehraiki et coll., article en révision).

A.3.2. Rôle du récepteur aux androgènes au cours du développement *in utero*

Le programme de l'Equipe 2 prévoyait également d'analyser le phénotype des souris déficientes pour le récepteur des androgènes.

L'Equipe a identifié plusieurs spécificités majeures de l'action des androgènes dans le testicule fœtal en comparaison avec le testicule adulte :

- Les androgènes ont un effet négatif sur la prolifération des cellules germinales fœtales alors qu'ils ont un effet positif sur la spermatogénèse adulte,
- Le récepteur des androgènes est localisé dans les cellules germinales mais non dans les cellules de Sertoli pendant la vie fœtale alors que l'inverse est observé chez l'adulte,

A.4. Anomalies du développement du testicule et de l'appareil génital mâle chez les rats exposés (Equipe 1)

Les fréquences d'anomalies du développement du tractus urogénital mâle sont résumées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Anomalies observées du développement urogénital (testicule non descendu, hypospadias, kystes/malformations épидидymaires, etc...)

	Contrôle	Génistéine 1mg/kg/j J0 (conception) – J21(PND)	Vinclozoline 1mg/kg/j J0 (conception) – J21(PND)	Génistéine+ Vinclozoline 1mg/kg/j+1mg/kg/j J0 (conception) – J21(PND)
Nombre de cas :	0/20	2/20	1/20	7/20

- C'est dans le groupe des animaux exposés à l'association des composés que le plus d'anomalies a été observé, pour environ un animal sur trois. Il s'agissait essentiellement de testicules non descendus de manière uni ou bilatérale. On notait par ailleurs dans quatre cas d'exposition au mélange des formations kystiques latérales de part et d'autre de la vessie.

Il est intéressant de préciser que dans la pré-étude, pour les mêmes doses, les taux globaux d'anomalies urogénitales observées étaient comparables : 2/25 pour l'exposition à la génistéine et à la vinclozoline et, 5 sur 21 pour l'exposition à l'association des deux composés.

Les observations indiquant des perturbations certes frustes de fonctions testiculaires chez le rat nouveau né et une fréquence augmentée des anomalies du développement urogénital suggèrent fortement que des concentrations significatives des composés et/ou de leurs métabolites actifs sont capables d'atteindre le testicule en développement lors de la gestation. Cette question n'a pas été étudiée dans le présent programme.

En résumé,

Seule une minorité d'animaux présentait des anomalies du développement du tractus urogénital pour les doses étudiées notamment lors des expositions isolées suggérant l'absence de dérégulation importante de la balance hormonale cruciale pour le développement du tractus et des mécanismes complexes présidant à la descente testiculaire. En revanche, l'association des deux molécules induisait des anomalies du développement urogénital dans un tiers à un quart des cas suggérant une synergie d'effets, les explorations des fonctions testiculaires conduites après exposition in vivo en néonatal ou in vitro suite à des expositions précoces ne permettant malheureusement pas de dégager des pistes sur les mécanismes d'action possiblement en œuvre lors de l'exposition combinée.

Cette partie du programme a fait (fera) l'objet des communications/publications référencées : 1, 2, 3, 7, 9, 10, 23, 26, 27

B. Les expositions gestationnelles/lactationnelles aux composés et doses faibles choisies perturbent-elles les distances anogénitales, la maturation postnatale du pénis et le timing de la puberté ? (Equipes 1 et 3 et 6)

Plusieurs travaux ont indiqué qu'une exposition gestationnelle/néonatale/lactationnelle à des PE était susceptible de perturber la maturation postnatale des organes sexuels ou de provoquer un retard (ou une avance) de la puberté.

B1. Distance anogénitale (Equipes 1 et 3)

Les distances anogénitales brutes et relatives mesurées au sevrage (sur l'ensemble des mâles) dans les groupes exposés n'étaient globalement pas significativement différentes de celles mesurées dans le groupe contrôle. Ces résultats diffèrent légèrement de ceux qui avaient été observés dans la pré-étude

où il existait une tendance à la réduction de la distance anogénitale ($p < 0,10$) pour les expositions à la vinclozoline seule ou associée à la génistéine.

B2. Maturité du pénis/ Déclenchement de la puberté (Equipes 3 et 1)

Le moment du début de la puberté chez le mâle défini comme étant le jour (post naissance) de séparation complète du prépuce (PPS) a été estimé (**Tableau 3**).

Tableau 3. Jour (nombre de jours après la naissance) de séparation du prépuce (PPS) dans les différentes modalités d'exposition

	C	G	V	GV
PPS (jours post naissance)	n=20 40,5 (2,6) ^{††,†}	n=20 41,4 (2,8)	n=19 42,9 (2,7) ^{††}	n=19 42,1 (1,8) [†]

[†] $p < 0,05$, ^{††} $p < 0,01$

La puberté était retardée dans les trois groupes d'exposition, le retard étant significatif pour les groupes V et GV et non significatif pour le groupe G.

Ces résultats allaient dans le même sens que ceux de la pré-étude où une immaturité significative du pénis à J25 avait été retrouvée plus fréquemment pour l'exposition à la vinclozoline et l'association génistéine/vinclozoline.

B3. Niveaux de génistéine et de vinclozoline dans le lait et transfert aux nouveaux-nés (Equipe 6)

La période post-natale est une période critique dans le développement de l'appareil reproducteur et les anomalies précédemment décrites indiquent une association avec l'exposition par voie orale des mères aux perturbateurs endocriniens, le lait pouvant contenir des résidus actifs. De ce fait, les petits non sevrés sont exposés, à chaque tétée, aux résidus contenus dans le lait.

L'Equipe 6 a étudié la possibilité que l'exposition indirecte des rats à la génistéine et/ou à la vinclozoline se poursuive en post-natal *via* le passage dans le lait des composés et/ou de leurs métabolites. Il n'existe pas de données à ce sujet chez le rat pour les composés étudiés aux doses faibles étudiées.

Afin d'établir un lien entre la dose d'exposition et les effets biologiques observés en post-natal, l'Equipe 6 s'est proposé de déterminer avec précision la nature et la quantité des résidus de vinclozoline et de génistéine présents dans le lait et de tenter de quantifier les niveaux d'absorption de ces composés par les nouveau-nés dans un modèle rat.

Les rates utilisées (*Sprague Dawley*) et leurs rats âgés de 6 jours ont été acclimatés pendant 11 jours avant de subir leur premier gavage (J17 et J18). Les prélèvements de lait et de sang ont été effectués 12 heures après le second gavage. Les traitements administrés étaient les suivants : 1) vinclozoline 1mg/kg, 2) génistéine 1mg/kg, 3) vinclozoline 1mg/kg et génistéine 1mg/kg, 4) vinclozoline 0,05mg/kg, 5) génistéine 0,05mg/kg et, 6) vinclozoline 0,05mg/kg et génistéine 0,05mg/kg. L'exposition des mères à la dose 0,05 mg/kg a été réalisée mais suite à un problème technique pendant l'analyse les échantillons n'ont pu être dosés. Les rendements d'extraction à partir des matrices lait et sang ont tout d'abord été déterminés: 75% pour les métabolites M1 et M2 de la vinclozoline et 77% génistéine. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont rassemblées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4. Limites de détection et quantification de la méthode d'analyse

	LD de la méthode d'analyse	LQ de la méthode d'analyse
Vinclozoline	20 pg/μL	50 pg/μL
M1	0,8 pg/μL	2,5 pg/μL
M2	0,04 pg/μL	0,1 pg/μL
Génistéine	1 pg/μL	2 pg/μL

L'utilisation de la vinclozoline marquée a permis de montrer que différents fluides biologiques et organes de rats mâles exposés à la vinclozoline contenaient des résidus quantifiables de vinclozoline (Tableau 5).

Tableau 5. Contamination des organes de rats par des résidus de vinclozoline*.

Organe / tissu	Concentration (équivalent vinclozoline)
Urine (contenue dans la vessie)	450 ± 35 ng/mL
Contenu stomacal	229,4 ± 65,8 ng/g
Contenu intestin grêle	154,4 ± 59,8 ng/g
Foie	42,9 ± 6,9 ng/g
Reins	46,6 ± 10,1 ng/g
Testicules	20,8 ± 3,5 ng/g
Sang	20 ± 6 ng/mL
Encéphale	15,0 ± 1,7 ng/g

* (les quantités de résidus calculées à partir de la quantification de la radioactivité correspondaient à l'ensemble vinclozoline+métabolites)

Bien qu'il n'ait pas été possible d'individualiser les métabolites, *les résultats montrent toutefois que la vinclozoline et/ou les métabolites sont éliminés par le lait qui est donc une source d'exposition des rats non sevrés. La vinclozoline et/ou les métabolites sont absorbés et distribués de façon large dans l'organisme des rats.*

Grâce à la mise au point du protocole de prélèvements et d'extraction/dosage, il a été possible de quantifier les différents composés (M1, M2 et génistéine) dans le lait, le sang maternel et le sang des jeunes rats. Les résultats sont rassemblés dans les Figures (Figures 6, 7 et 8) qui suivent.

Figure 6. Concentration des résidus dans le lait (■ : mère exposées soit à la vinclozoline soit à la génistéine ; ■ : mères exposées à la vinclozoline et à la génistéine)

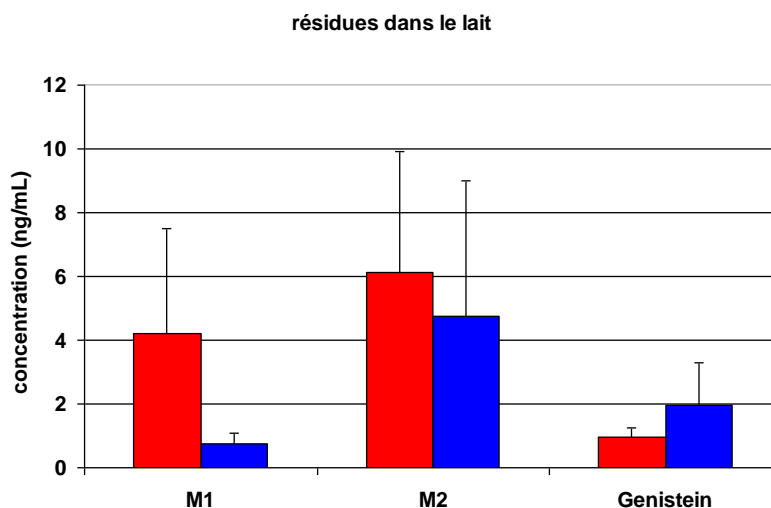


Figure 7. Concentrations des résidus dans le sang maternel (■ : mère exposées soit à la vinclozoline soit à la génistéine ; ■ : mères exposées à la vinclozoline et à la génistéine)

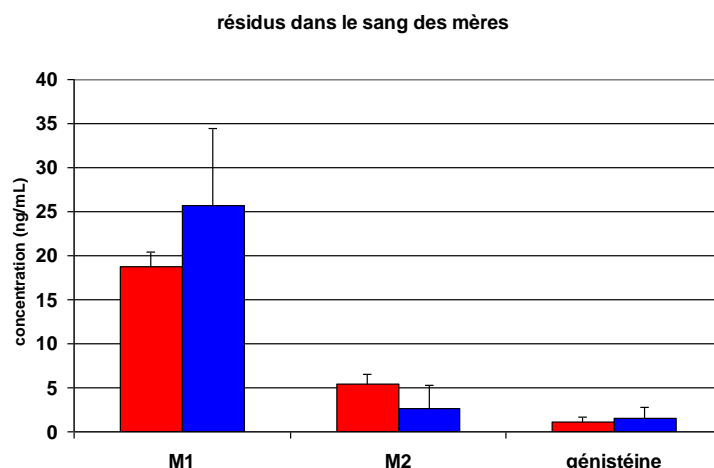
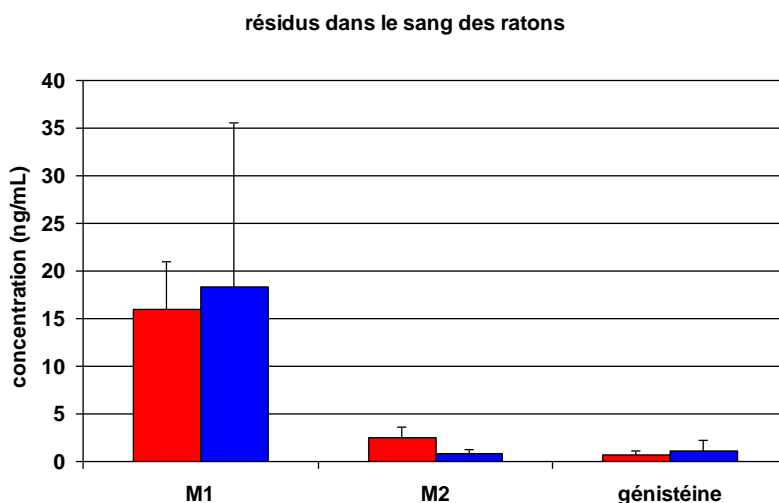


Figure 8. Concentrations des résidus dans le sang des ratons (■ : mère exposées soit à la vinclozoline soit à la génistéine ; ■ : mères exposées à la vinclozoline et à la génistéine)



La vinclozoline n'a pas été retrouvée en tant que telle (< LD), en revanche, les métabolites M1 et M2, qui sont actifs en matière de perturbation endocrinienne sont retrouvés dans le lait et dans les échantillons de sang.

M2 était le métabolite principal dans le lait, M1 était le métabolite principal dans le sang. Le profil des résidus dans le sang des ratons était similaire à celui des mères et différent de celui du lait. Les concentrations en M1 et M2 semblent différentes en fonction de l'exposition des mères (vinclozoline seule ou associée avec de la génistéine, simple tendance).

Les concentrations en génistéine du sang des mères et du lait étaient relativement faibles : $1,08 \pm 0,55$ ng/mL et $0,96 \pm 0,03$ ng/mL; dans le cas de l'association à la vinclozoline, les valeurs étaient respectivement de $1,54 \pm 1,27$ ng/mL et $1,97 \pm 1,33$ ng/mL. En conséquence, les concentrations en génistéine du sang des ratons étaient basses).

En résumé, cette étude a montré que les ratons non sevrés qui tètent des mères exposées par voie orale à de la vinclozoline et/ou de la génistéine sont exposés aux métabolites M1 et M2 ainsi qu'à la génistéine par le lait de leur mère dans une période critique du développement notamment de l'appareil reproducteur.

Cette partie du programme a fait (fera) l'objet des communications/publications référencées : 7, 23, 25, 26, 27

L'Equipe 6 s'est aussi proposé de tenter de répondre à une question importante non résolue pouvant concerner toutes les équipes impliquées dans le programme dès lors que des effets sont observés avec la génistéine seule ou en association à la vinclozoline: Ces effets ne sont possibles que si la molécule elle même est retrouvée à des concentrations significatives dans les organes et tissus. Or, la génistéine est principalement conjuguée à l'acide glucuronique chez les mammifères (Bursztyka et al., 2008) et c'est sous forme de glucuronide que la génistéine est retrouvée dans le sang et l'urine. Ce métabolite est dépourvu d'activité oestrogénique. Il n'est toutefois pas exclu que le conjugué à l'acide glucuronique de la génistéine puisse être déconjugué dans les tissus cibles tels que les ovaires ou l'utérus pour libérer la molécule active.

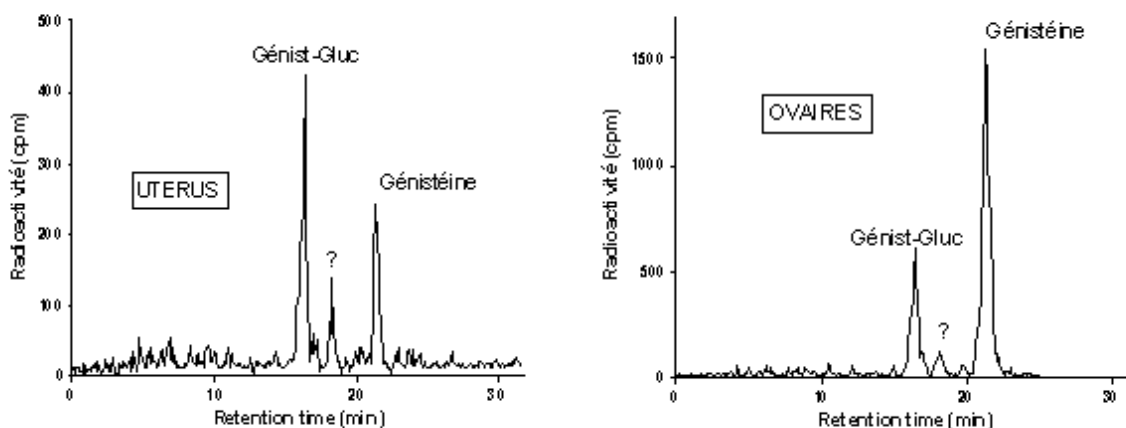
C'est précisément l'hypothèse qu'une l'hydrolyse du glucuronide de la génistéine peut s'effectuer dans les organes et tissus cible qui a été testée. Le travail a porté sur des préparations *ex vivo* d'ovaire et d'utérus de rate.

La génistéine glucuro-conjuguée a été synthétisée en incubant de la ^{14}C -génistéine avec des microsomes de foie de rat, en présence d'UDPGA. Le conjugué a été purifié par HPLC et caractérisé par LC-MS.

Le glucuronide radio-marqué a été incubé en triplicat durant 8 h à 37°C dans 1mL de tampon NaCl 0,9% en présence de d'ovaires excisés à partir de rattes *Sprague Dawley* matures ou d'utérus prélevés chez les mêmes animaux et ouverts. Le poids moyen pour les ovaires était de 240 mg, celui des utérus était de 728 mg. Chaque incubation a été effectuée avec 16 µg de glucuronide. Les surnageants ont été recueillis et analysés en radio-HPLC. Les composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention, comparé à celui de standards dûment caractérisés.

Les profils radio-HPLC (Figure 9) font apparaitre des taux d'hydrolyse de plus de 90% pour les ovaires et de plus de 30% pour l'utérus, démontrant que ces tissus hormono-sensibles sont parfaitement capables de réaliser la déconjugaison du glucuronide et de libérer *in situ* la génistéine. Un métabolite mineur a également été détecté, mais n'a pu être identifié.

Figure 9. Profils radio-HPLC de surnageants d'incubation de ^{14}C -génistéine-glucuronide avec des prélèvements d'utérus ou d'ovaires de rates.



C. Les expositions gestationnelles/lactationnelles à la génistéine et/ou à la vinclozoline à doses faibles perturbent-elles le développement de la glande mammaire ? études en péripubertaire (Equipes 4 et 3)

L'Equipe 4 avait pour mission d'étudier, en collaboration avec l'Equipe 3, le développement de la glande mammaire après administration de génistéine, vinclozoline et du mélange de ces deux substances à l'aide de différentes approches. Une étude de la vascularisation était secondairement envisagée, afin de préciser si des altérations de la vascularisation sont associées à une altération du développement de la glande mammaire.

C.1. Développement de la glande mammaire à la puberté

Le développement de la glande mammaire nécessite l'interaction de différentes hormones, telles que l'oestradiol (E2), la progestérone, la prolactine, ainsi que plusieurs facteurs de croissance tels que l'EGF, le TGF α et l'IGF. Pendant la période pré-pubère, ce développement est sous contrôle des oestrogènes qui stimulent la formation des canaux et induisent une prolifération élevée des extrémités terminales des canaux (TEB). Les effets des androgènes sur la glande mammaire sont très mal connus.

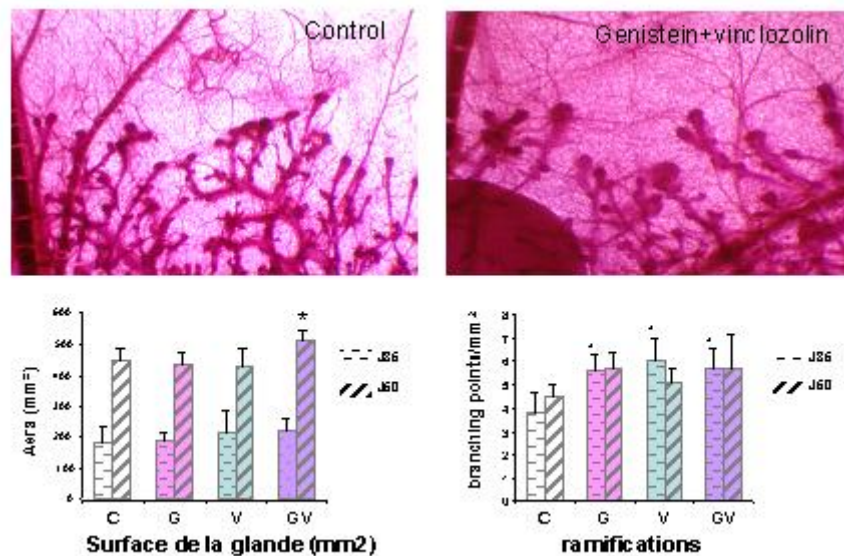
L'évaluation de possibles retentissements des expositions sur la glande mammaire a reposé sur plusieurs approches: technique de la glande étalée ou 'Whole Mount', analyses histologiques classiques et plus spécifiques, immunohistochimie.

C.1.1. Etude des Whole mounts

Les Whole mounts ont été réalisés sur la 4^{ème} et la 5^{ème} glande mammaire droite (8 rats/lots) par P. Phrakhonkam, étudiant en thèse d'université, dans l'Equipe 3 (INRA-Dijon) sous la direction de M.C. Canivenc-Lavier. Cet étudiant avait auparavant acquis la technique auprès du groupe d'Ana Soto (Boston, USA), technique permettant d'estimer plusieurs paramètres, surface glandulaire totale, nombre des branchements ductaux et des structures épithéliales (extrémités ductales, bourgeons alvéolaires) aux étapes de développement choisies.

Chez les animaux traités, les analyses morphométriques font apparaître principalement des différences des branchements ductaux au début de la puberté J35 et de la surface glandulaire avec le mélange à J50 (**Figure 10**) A la fin de la puberté (J50), la glande mammaire est significativement plus développée chez les animaux exposés au mélange

Figure 10. Exemples d'anomalies morphogéniques de glande mammaire observées par Whole mount chez les animaux témoins et traités par la génistéine, la vinclozoline ou le mélange des deux. *= $p < 0,05$



C.1.2. Analyse histologique conventionnelle

L'étude histologique du développement de la glande mammaire de rat sur coupe en paraffine et après coloration hématoxyline-éosine a été faite au sein de l'Equipe 4, sous la direction de Martine Applanat (M. Djallali, étudiant en M2 Reproduction, Paris XI, et plus récemment, H. Saad, étudiante en Thèse, Paris VII). Quatre vingt glandes mammaires ont été examinées, dont 10 glandes par traitement (n=3)

et par contrôle, à deux périodes après la naissance : à J35 (début de la puberté) et à J50 (animaux cyclés). Les glandes ont été examinées en réalisant des coupes à 3 niveaux différents de chaque glande. Les analyses qualitatives, réalisées sur tous les animaux de chaque lot, ont tout d'abord permis de constater l'existence d'anomalies de développement, telles que prolifération épithéliale, nature des branchements ductaux, analyse du stroma péri-ductal, du développement lobulo-alvéolaire (chez les animaux cyclés, à J50 post-natal), de la vascularisation. Les analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées sur chaque glande en double aveugle, en collaboration avec un médecin anatomo-pathologiste (G. Meduri, Kremlin Bicêtre). Une analyse quantitative des différents changements histologiques observés a été entreprise, prolifération épithéliale en particulier. Nous présentons quelques résultats (**Figure 11**). Les résultats avec analyse statistique seront donnés dans la publication.

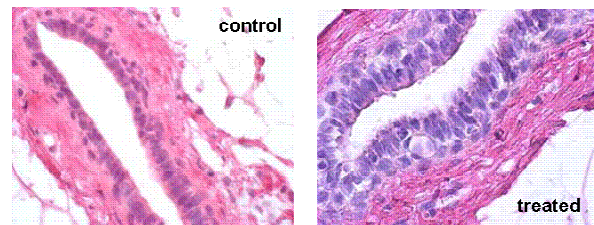
- En période pré-pubertaire (J35), les bourgeons terminaux sont plus développés dans les glandes mammaires des animaux traités avec la génistéine par rapport aux animaux témoins. Cet effet s'atténue à J50. L'étude de la prolifération épithéliale a également été effectuée sur ces glandes à l'aide du marqueur de prolifération Ki-67. Cet index est nettement augmenté avec la génistéine à J35 au niveau des TEB

Le traitement à la vinclozoline ou au mélange génistéine/vinclozoline conduit à une certaine désorganisation du tissu glandulaire à J35 (branchements anormaux au niveau des canaux, prolifération épithéliale par rapport aux animaux témoins (Figure 11) place de la figure. Ces modifications se retrouvent accentuées en période post-pubertaire (animaux cyclés à J50) ; en particulier, le traitement à la vinclozoline ou au mélange génistéine/vinclozoline conduit à des anomalies du développement alvéolaire, parmi lesquelles des hyperplasies épithéliales.

Figure 11. Exemples d'anomalies de développement de la glande mammaire chez des animaux traités par la génistéine, la vinclozoline ou le mélange des deux. A, anomalies ductales à J35. B, hyperplasie glandulaire à J50. (HE) ; Grossissement x 20 (A) et x 40 (B).

A

B



C.1.3. Immunohistochimie des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone (Equipe 4)

L'étude de la réceptivité hormonale de la glande mammaire des animaux traités par rapport aux témoins a été analysée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les récepteurs à l'œstradiol et à la progestérone. Cette étude a été relativement fastidieuse, car il a été difficile de sélectionner de bon anticorps chez le rat.

Des résultats nouveaux concernant l'effet des traitements sur l'augmentation de l'expression des récepteurs aux oestrogènes et leur distribution ont été mis en évidence. Pour compléter ces résultats de manière quantitative, nous avons extrait les ARNm à partir des différentes glandes et prévu une analyse quantitative par qPCR de ces récepteurs dans les différents échantillons. Cette étude, initialement non prévue, a été ajoutée au programme et les résultats sont en cours d'analyse.

C.2. Etude de la vascularisation (Equipe 4)

Par le passé, l'Equipe 4 a montré que le VEGF, facteur de perméabilité vasculaire et facteur angiogénique majeur stimulant la prolifération et la migration endothéliale *in vitro* et *in vivo*, est un gène cible pour les oestrogènes dans la glande mammaire et les cellules tumorales mammaires (ER α +). Préalablement à ce programme, l'Equipe 4 a étudié la capacité de la génistéine et de la

vinclozoline à moduler l'expression du VEGF dans des cellules tumorales mammaires (ER α + / ER β -) ou des cellules transfectées avec le plasmide codant pour ER β . Les résultats indiquaient une augmentation de l'expression du VEGF avec la génistéine mais non avec la vinclozoline (Buteau-Lozano, J Endocrinol, 2008). Dans le présent programme, l'expression du VEGF a été étudiée par immunohistochimie dans les différentes préparations de glande mammaire d'animaux exposés et non exposés. ***L'analyse ne retrouve pas de modification majeure de l'expression du VEGF dans les préparations de glande mammaire d'animaux exposés à la génistéine, à la vinclozoline ou à leur association en comparaison aux témoins.***

L'Equipe 4 a ultérieurement choisi de compléter cette étude sur le phénotype des glandes mammaires à la puberté chez les rattes dont les mères ont été traitées *in utero* et pendant la lactation par l'analyse moléculaire (transcriptomique) des glandes mammaires prélevées. Cette étude n'était pas prévue initialement dans le programme; elle a été décidée au vu des résultats importants précédemment exposés, mettant en évidence des phénotypes différents chez les animaux traités, en particulier avec le mélange génistéine+vinclozoline); l'analyse transcriptomique a été initiée en collaboration avec D. Vaiman (Cochin). Les résultats sont prévus pour 2009.

Compte tenu de cette évolution, l'étude des effets d'une exposition du sevrage à l'âge adulte a démarré très tardivement avec les coupes en paraffine ; l'analyse sera jointe au programme CIME (PNRPE2008)

En résumé, L'exposition à la génistéine administrée à faible dose in utero et durant la lactation montre une prolifération épithéliale plus élevée de la glande mammaire en période péri-pubertaire ; les données avec la génistéine sont en accord avec les données de la littérature. Des résultats entièrement nouveaux ont été obtenus après administration de vinclozoline, et/ou du mélange de génistéine et vinclozoline à faibles doses (1 mg/kg/j); ces résultats concernent des modifications anatomo-pathologiques du développement de la glande mammaire à la puberté ; ces modifications impliquent de surcroît des variations de réceptivité hormonale. Ainsi, la glande mammaire apparaît comme une cible importante de la vinclozoline, seule ou en association avec la génistéine administrée à 1 mg/j/kg.

Cette partie du programme a fait (fera) l'objet des communications/publications mémoires et thèses référencés : 16, 23, 28, 31, 32

Perspectives

Ces données indiquent un effet des androgènes sur le développement de la glande mammaire. Ces effets, insuffisamment étudiés à ce jour, suggèrent de plus la possibilité d'interrelations entre androgènes et oestrogènes dans le développement mammaire. L'approche transcriptomique (et validation RT-PCR) devrait nous permettre de caractériser des gènes d'intérêt dans le développement de la glande mammaire. Les gènes cible de ER (et AR) seront étudiés avec une attention particulière, car ils représentent une information capitale sur le plan environnement et toxicologique, compte tenu de l'exposition importante des populations aux ligands de ce(s) récepteur(s).

Note concernant les organes de la reproduction femelle

En ce qui concerne les organes reproducteurs femelles, les résultats obtenus dans le cadre de la pré-étude ne montraient pas d'effets des expositions sur les organes génitaux, sauf une diminution du poids des ovaires lors de l'exposition à l'association des composés à des doses intermédiaires (10mg/kg/j de génistéine + 30mg/kg/j de vinclozoline).

Dans le programme, l'étude des organes reproducteurs chez la femelle s'est limitée aux prélèvements et stockages des organes reproducteurs en vue d'une analyse ultérieure. Les mesures pondérales ne font cependant pas apparaître d'effet utéro-trophique ni d'hypoplasie ovarienne dans les conditions d'exposition périnatale. De même les frottis vaginaux ne présentaient pas d'anomalies particulières. Cependant, chez les rats traités à la génistéine et au mélange génistéine/vinclozoline, un léger avancement de la puberté (ouverture vaginale) est noté. Une analyse plus fine implique de faire appel à des outils moléculaires (protéomique/génomique) qui n'avaient pas été budgétisés dans ce programme et qui pourront faire l'objet d'un prochain projet.

D. Les expositions gestationnelles/lactationnelles à la génistéine et/ou à la vinclozoline à doses faibles perturbent-elles le développement du cartilage? études en péripubertaire (Equipes 5)

La participation de l'Equipe 5 au projet s'est focalisée sur une observation antérieure, la déformation avec un aspect cannelé des queues de rats adultes traités par la vinclozoline. Cette observation non publiée, fut faite sur des rats adultes exposés *via* la mère pendant la gestation et la lactation puis traités oralement par 30 mg/kg de vinclozoline tous les deux jours jusqu'au sacrifice (**Figure 12**).

Figure 12. Aspects de queues de rats traités de manière chronique à la vinclozoline



Queues des témoins

Queues annelées après exposition de rats adultes à la vinclozoline 30 mg/kg/J

J. AUGER et M.C. CANIVENC, non publié

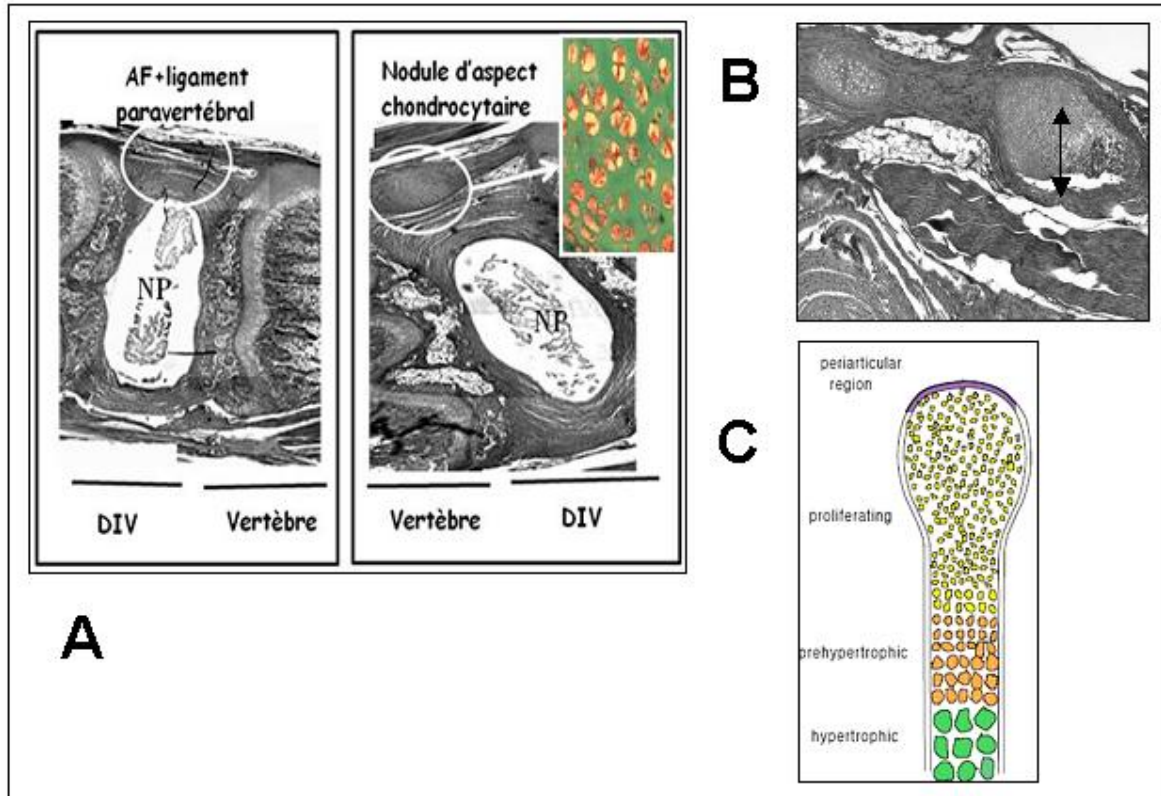
Parmi les tissus cible potentiels des PE, l'Equipe 5 s'intéresse plus particulièrement au développement du squelette et à la croissance osseuse. Les données de la littérature dans ce domaine sont restreintes. Le 17 α -éthinyloestradiol induit des malformations vertébrales importantes chez les poissons mais pas le bisphénol A (BPA). Différents pesticides provoquent des anomalies multiples du cartilage dans des modèles de mammifères, notamment la formation de cartilage ectopique.

D1. Analyse histologique.

L'optimisation de la déminéralisation des vertèbres pour permettre des coupes non déformantes s'est avérée difficile, notamment sur le plan de la conservation morphologique du noyau central du disque (nucleus pulposus). Cette difficulté a été résolue et le travail de constitution de coupes sériées après déminéralisation a été terminé.

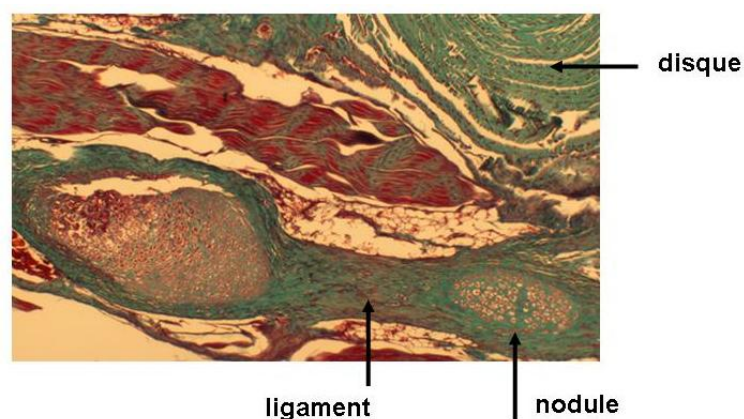
Les premiers résultats montrent l'existence de malformations morphologiques des queues des rats induites par la vinclozoline et la génistéine aux faibles doses. Les queues sont cannelées, avec la présence de nodules au toucher, régulièrement répartis sur toute la longueur de la queue (Figure 13). Les corps vertébraux et les disques intervertébraux (DIV) paraissent normaux. Les images évoquent la présence de tissu cartilagineux (Figure 13B) à l'intérieur de chaque nodule. Il pourrait s'agir d'excroissances de tissus environnants (vertèbres, DIV, tissu adipeux) ou de néoformations à partir de cellules mésenchymateuses souches environnantes.

Figure 13. Les nodules néoformés. A : la photo de gauche montre la situation « normale » chez une femelle témoin à J35, la photo de droite montre la localisation d'un nodule induit par la vinclozoline chez une femelle à J35. B : nodules cartilagineux (flèche) présentant la différenciation complète des chondrocytes : quiescents, prolifératifs, pré-hypertrophiques et hypertrophiques (nodules observés à J35 chez une femelle exposée à la vinclozoline). C : schéma de la différenciation chondrocytaire dans un os long d'animal immature.



L'hypothèse faite initialement par l'Equipe 5 concernant ces résultats était que les PE ont agi localement soit sur des chondrocytes du disque ou des vertèbres, soit sur des cellules souches locales, en modifiant le processus de l'induction chondrogénique, osseuse ou adipogénique lors du développement. L'analyse plus complète des queues de rats et rattes a modifié cette hypothèse initiale d'une formation ectopique *de novo*. La préparation de coupes sériées sur chaque échantillon montre que les nodules sont présents dans la zone tendineuse d'un muscle releveur attaché aux vertèbres du côté « ventral » de la queue.

Figure 14. Présence de nodules dans une zone d'aspect ligamentaire



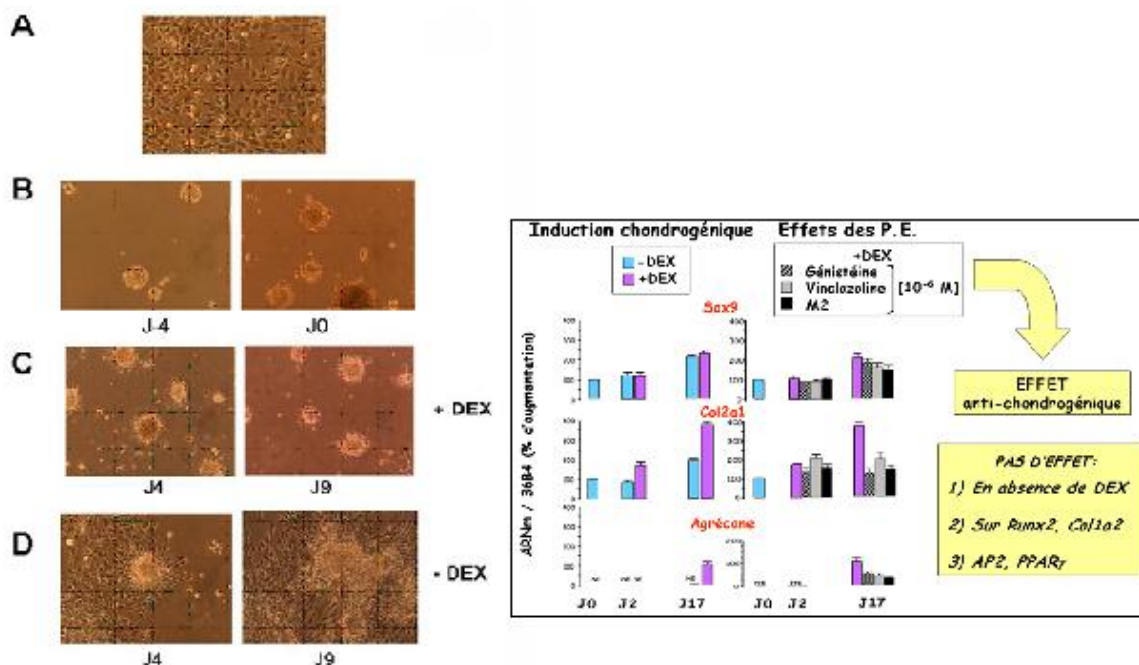
Cette exploration plus approfondie révèle la présence de petits nodules peu différenciés chez certains animaux témoins, bien que la plupart soient négatifs. **Il pourrait donc s'agir de formations normales, dormantes ou s'involuant avec le temps, et dont la prolifération serait réactivée par les PE**. Cette étude requiert une analyse statistique.

Perspectives

Pour répondre à ces questions, une nouvelle étude a été mise en route dans le cadre du PNRPE 2008 de façon à caractériser *in vivo* la nature du contenu cellulaire de ces anomalies sur des coupes sériées de la queue, du rachis vertébral dans son ensemble ainsi que des os des membres. Une analyse par imagerie sur corps entier (scan puis microscan) devrait permettre de visualiser toute la queue et d'éviter des faux négatifs liés à des coupes aléatoires.

Une analyse mécanistique *in vitro* est prévue. Nous proposons que ces formations puissent être générées ou stimulées à partir de cellules souches mésenchymateuses résidentes pluripotentes. Pour explorer cette hypothèse, nous utilisons la lignée mésoblastique C1 qui, selon les inducteurs utilisés, se différencie sélectivement vers la chondrogénèse, l'ostéogénèse ou l'adipogénèse après une étape d'agrégation. Nous induisons les cellules C1 vers la différenciation chondrogénique pour rechercher une interférence des PE. Dans ce modèle, les C1 agrégées sont incubées à J0 en présence de dexaméthasone (DEX, 10^{-7} M). Les PE (10^{-6} M) sont ajoutés à chaque changement de milieu. Leurs effets sur les marqueurs chondrogéniques sont analysés par qPCR à J2 et à J17 par comparaison avec leur expression à J0 et à des cellules non traitées. La DEX est indispensable pour conserver les agrégats de J0 à J17.

Figure 15. Effets *in vitro*. La **Figure 15A** montre la première culture en monocouche. (la **Figure 15B** montre la constitution des agrégats maintenus par la DEX (**Figure 15C** à J4 et J9). L'absence de DEX entraîne la dislocation des agrégats (**Figure 15 D**, à J4 et J9). Le panel de droite montre les effets des PE



Ce modèle vient d'être établi au laboratoire. La DEX stimule l'induction chondrogénique en augmentant l'expression des marqueurs spécifiques Sox9, Col2A1 et Agrécane, alors que les transcrits de COL1A1, AP2, et Runx2 ne sont pas modifiés (Figure 5). Nous analysons les effets de l'addition de chaque PE sur les marqueurs chondrogéniques (Sox9, Col 2A1, Agrécane, MGP...) et non chondrogéniques (Runx2, AP2, Col1a2).

Aussi bien la DEX que les PE ont de multiples impacts où des interférences pourraient se produire (PXR; kinases; NF-kB ou Cytochromes P450). L'activation des récepteurs RE et RA par les PE peut

provoquer une interférence avec les effets de la DEX liés au récepteur des Glucocorticoïdes (GR). La croissance du squelette osseux est contrôlée par de nombreux facteurs locaux et hormonaux. Les RE sont exprimés dans le cartilage post-natal. Les troubles de développement du cartilage induits par l'ovariectomie montrent que les oestrogènes et leur récepteur RE sont un déterminant majeur de la différenciation du cartilage de croissance. Nous avons précédemment montré que les oestrogènes sont actifs à faible dose sur le phénotype chondrocytaire. Les deux PE analysés sont des oestrogènes ou des anti-androgènes et un effet des PE au niveau de ces récepteurs dans le cartilage apparaît plausible. Dans un second temps, nous souhaitons caractériser la nature cartilagineuse et/ou osseuse des nodules induits *in vivo*. Sont-elle limitées à la partie caudale de la colonne vertébrale ou existe-t-il également tout au long de la colonne vertébrale ? Existe-t-il chez ces animaux des modifications des articulations à l'âge adulte évoquant les néo-formations cartilagineuses de l'arthrose chez l'homme?

Cette partie du programme a fait (fera) l'objet des communications/publications référencées : 15, 23, 26, 27, 29

E. Effets différentiels de la génistéine et/ou de la vinclozoline à faibles doses selon la fenêtre d'exposition, gestation/lactation *versus* puberté/adulte: 1) comportement alimentaire à l'âge adulte et glandes salivaires et, 2) appareil reproducteur adulte et fonction de reproduction mâle (Equipes 3 et 1)

E.1. Comportement alimentaire à l'âge adulte et glandes salivaires (Equipe 3)

L'Equipe 3 se consacre à la régulation hormonale des perceptions gustatives et des préférences alimentaires, lesquelles varient selon le sexe, l'âge, le statut physiologique (grossesse, ménopause, vieillissement, santé), et donc selon le statut hormonal.

La présence alimentaire de composés dotés de propriétés hormonales (phyto-oestrogènes, pesticides, migrants d'emballages alimentaires, certains additifs...) a conduit à postuler que, à l'image des effets observés avec le DES, des expositions utérines ou néonatales à des composés de type xéno-hormones ou phyto-oestrogènes peuvent jouer un rôle dans l'étiologie de l'obésité (Colloque NIH 2004) notamment en modulant les préférences alimentaires. Dans le présent programme, l'objectif de l'Equipe 3 était de rechercher si une exposition aux deux molécules phares que sont la génistéine (œstrogénique) et la vinclozoline (anti-androgénique) modulait le contrôle des perceptions gustatives et de la prise alimentaire, le tissu adipeux et les glandes salivaires physiologiquement régulées par les hormones sexuelles et donc susceptibles d'être des cibles potentielles des xéno-hormones alimentaires.

Note

En raison des restrictions budgétaires imposées lors de la validation de ce projet, et de la redéfinition du travail de l'équipe lors de la fusion des UMR TA et FLAVIC (2007), le programme de l'Equipe 3 a été révisé : les études envisagées sur les glandes olfactives et sur souris transgéniques ont été retirées du programme (ré-affectation du chercheur concerné). L'étude des glandes salivaires concernait en principe les trois types de glandes salivaires (sub-mandibulaires, sublinguales et parotides) : compte tenu des mises au point techniques à faire sur ce nouveau tissu, l'étude a été surtout approfondie sur les sub-mandibulaires dont les liens avec les mécanismes de gustation, mais aussi d'infertilité et de développement sont les plus documentés.

Par contre, l'étude concernant l'impact des composés étudiés sur les préférences gustatives a été élargie aux deux modèles d'exposition animale (gestation/lactation *versus* puberté/adulte) et approfondie au niveau des effets sur les préférences au sucré. De plus, l'Equipe 3 a initié une étude *in vitro* sur la compréhension des mécanismes reliant les processus de prise alimentaire et les effets sur le tissu adipeux (adipogenèse, synthèse de leptine).

E.1.1. Comportement alimentaire

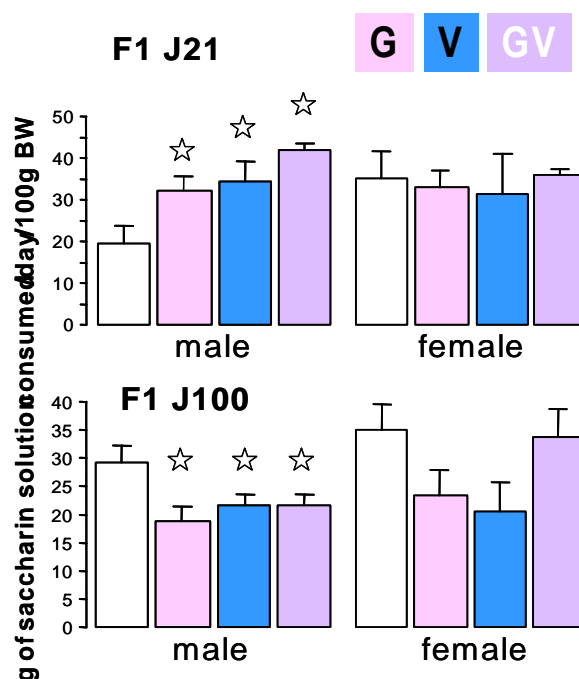
L'étude des effets de la génistéine et/ou de la vinclozoline sur le comportement alimentaire associe des mesures régulières de la croissance et de la prise alimentaire pendant et après l'exposition aux PE, des tests de préférences à différents stades de développement (choix entre un biberon d'eau plate et un biberon de soluté) et une analyse de la répartition adipeuse chez le rat lors du sacrifice.

D'une manière globale, les traitements, quelle que soit la période d'exposition, n'ont pas entraîné d'effets majeurs sur la croissance et sur la prise alimentaire des animaux, même dans le cas de l'exposition au mélange.

De plus, les différentes modalités d'exposition ne modifiaient pas de manière significative la masse grasseuse. Il faut cependant noter que les mâles exposés pendant la période gestationnelle et lactationnelle à la génistéine avaient une tendance à être plus gros. Cette observation avait déjà été faite dans la pré-étude en exposition continue de la conception à l'âge adulte. Aussi, cette question sera réexaminée avec attention dans le programme CIME (PNRPE2008) dont la thématique et les objectifs sont dans la continuité du présent programme.

En ce qui concerne les préférences gustatives, les effets ont initialement été étudiés sur trois saveurs, le sucré (solutions de saccharine), le salé (solutions de NaCl) et l'amer (solutions de quinine), qui sont régulées par les hormones sexuelles. Conformément à la littérature, des différences de préférences sensorielles liées au sexe ont été retrouvées par chacune d'entre elles. En revanche, ***les expositions ont seulement affecté les perceptions au sucré.*** Comme l'illustre la **Figure 16**, cet effet s'exprimait surtout de manière sélective et significative chez le mâle. Il faut noter ici que la génistéine et la vinclozoline induisent le même phénotype comportemental, avec des effets majorés par le mélange.

Figure 16. Résultats des tests de préférence au sucré : différences observées selon que l'exposition était gestationnelle lactationnelle (F1 J21) ou de la puberté à l'âge adulte (F1 J100). Observations dans les deux sexes; G= exposition à la génistéine seule à 1mg/kg/j; V : exposition à la vinclozoline seule à 1mg/kg/j; GV : exposition à l'association des deux molécules aux mêmes doses ; ☆ : $p < 0,05$



Les effets différaient selon l'exposition :

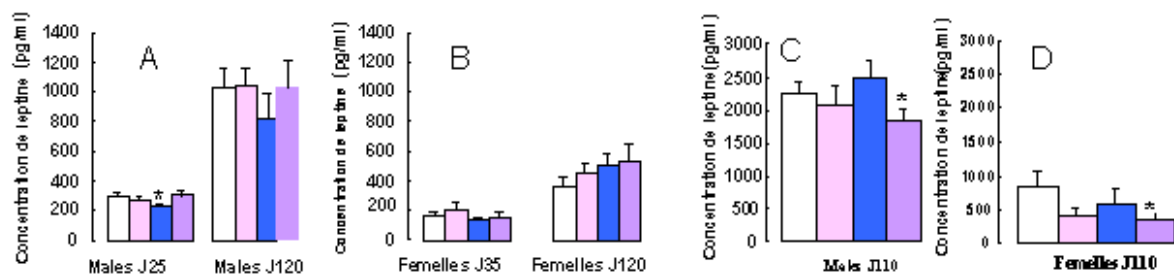
- ***Une exposition périnatale stimulait de manière significative les préférences au sucré chez les mâles immatures, traduisant une féminisation du comportement alimentaire.*** Cet effet disparaissait à l'âge adulte.
- ***Une exposition après sevrage jusqu'à l'âge adulte (J100) induisait une diminution significative des préférences au sucré chez les mâles uniquement.*** Par contre, l'augmentation de la préférence au salé classiquement rencontrée à ce stade lors d'une exposition à l'oestradiol n'a pas été observée, même lors d'une exposition à la génistéine.

E.1.2. Leptinémie

L'hypothèse que les modifications des perceptions au sucré observées pouvaient être la conséquence d'une action des composés sur la synthèse de leptine - principale hormone du tissu adipeux pouvant diminuer la prise alimentaire, mais aussi les perceptions gustatives au sucré en agissant au niveau des bourgeons du goût et du système nerveux central - a été faite.

Les taux de leptine circulante dans le sang prélevé le jour du sacrifice ont été mesurés (test ELISA) chez les mâles et les femelles et dans les deux fenêtres d'exposition, gestation/lactation et puberté/adulte (**Figure 17**). Il est intéressant de noter que les taux de leptine étaient corrélés aux mesures de préférence au sucré dans le cas des animaux témoins.

Figure 17. Effets des expositions à la génistéine (■), à la vinclozoline (■) ou, à leur mélange (■) sur la leptinémie chez le rat mâle (A,C) et femelle (B,D) lors de l'exposition gestation/lactation (A et B) et sevrage/adulte (C et D). * : $p < 0,05$



- Le dimorphisme sexuel pour les taux de leptine décrit dans la littérature était retrouvé, les taux sériques étant plus élevés chez les mâles que chez les femelles,
- Les taux moyens de leptine différaient selon la période du développement (par exemple, Figure 17A pour les rats témoin),
- **Chez la femelle**, l'exposition gestationnelle/lactationnelle n'avait aucun impact sur les taux de leptine mesurés peu de temps après l'arrêt de l'exposition (J35) ou à distance, à l'âge adulte (J120) alors que **les taux de leptine observés après une exposition de la puberté à l'âge adulte étaient diminués (de manière significative pour l'association génistéine/vinclozoline)**,
- **Chez le mâle, au décours d'une exposition gestationnelle/lactationnelle, les taux de leptine étaient significativement diminués uniquement dans le groupe exposé à la vinclozoline**, cette observation n'étant plus faite à distance de l'exposition (J120),
- **Chez le mâle, au décours d'une exposition de la puberté à l'âge adulte, les taux de leptine étaient significativement diminués uniquement dans le groupe d'animaux exposés à l'association génistéine/vinclozoline.**

E.1.3. Différenciation et fonction adipocytaire

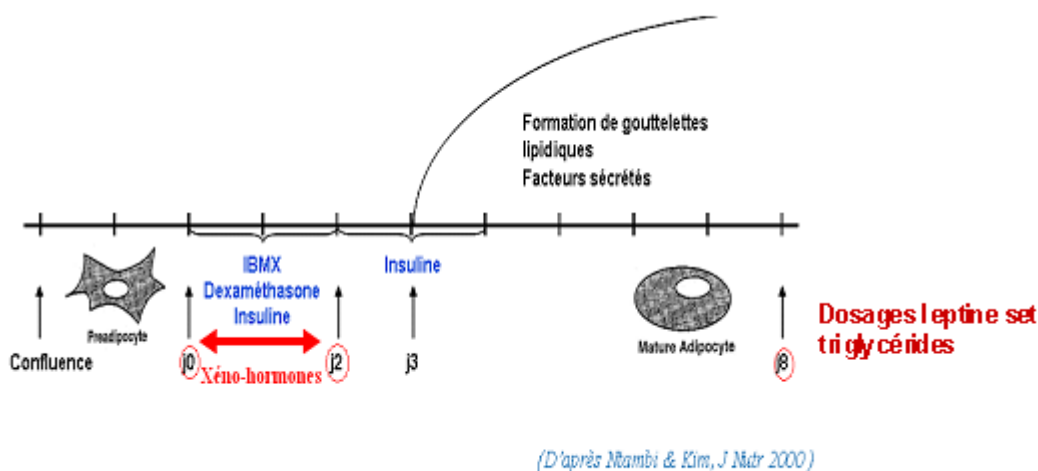
Chez l'animal immature, les effets observés sur la leptinémie pourraient provenir d'une diminution de la synthèse de leptine via une action sur la différenciation adipocytaire, celle-ci s'opérant pendant la période de gestation. Afin de vérifier cette hypothèse, l'effet de faibles doses compatibles avec les doses circulantes en génistéine et vinclozoline sur la différenciation adipocytaire de pré-adipocytes en culture (3T3L1) a été étudié.

La transformation des pré-adipocytes en adipocyte est initiée par un cocktail de différenciation. Après trois jours de culture, les adipocytes commencent à produire des marqueurs de différenciation: gouttelettes lipidiques, adipokines, récepteurs hormonaux.. Les triglycérides et la leptine sont considérés comme des marqueurs tardifs apparaissant au bout d'une semaine de culture.

Les molécules, seules ou en mélange, ont été ajoutées au milieu de culture pendant l'étape de différenciation adipocytaire, les synthèses de triglycérides et de leptine ont été mesurées au stade adipocyte mature

(J8 ; **Figure 18**). Les concentrations de génistéine et de vinclozoline correspondaient aux doses circulantes (génistéine : 25µM, vinclozoline : 10µM).

Figure 18. Processus de différenciation adipocytaire des 3T3-L1 et schéma expérimental



- Au vu du nombre d'adipocytes formés, l'effet sur la différenciation était faible,
- Cependant, **la génistéine, seule ou en mélange avec la vinclozoline, altérait la synthèse des triglycérides**, la vinclozoline seule étant sans effet,
- Isolément, chacune des molécules affectait peu ou pas la synthèse de leptine alors que **l'association génistéine/vinclozoline induisait fortement la synthèse de leptine**.

Note

Il est prévu de poursuivre cette étude sur le tissu adipeux dans le programme CIME (PNR-PE 2008) débutant prochainement.

Néanmoins, ces travaux préliminaires indiquent qu'il n'est pas possible de relier systématiquement l'effet sur les préférences au sucré à un effet sur la leptinémie ou sur la différenciation adipocytaire. Ils suggèrent une régulation multifactorielle.

E.1.4. Effets sur les glandes salivaires submandibulaires

Les glandes salivaires, principal producteur d'EGF, exercent des fonctions endocrines sur les organes périphériques via ce facteur de croissance. L'EGF est impliqué dans la gamétogenèse, la morphogenèse mammaire et utérine et également dans le maintien des bourgeons gustatifs. D'autres protéines salivaires interviennent dans le transport ou la libération des molécules sapides. La structure et la fonction des glandes salivaires sont régulées par les hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes et cortico-surréaliennes. Elles constituent une cible privilégiée et non étudiée des perturbateurs endocriniens. Leur localisation anatomique fait que ces glandes sont les premiers organes au contact des molécules absorbées au niveau buccal lors de la mastication du bol alimentaire. Le premier objectif a été de les identifier comme nouvelle cible de perturbateurs endocriniens. Ne sont présentées ici que les résultats sur les glandes submandibulaires dont les études sont les plus avancées. Elles ont été prélevées sur les animaux pour lesquels les tests de comportement alimentaire ont été faits.

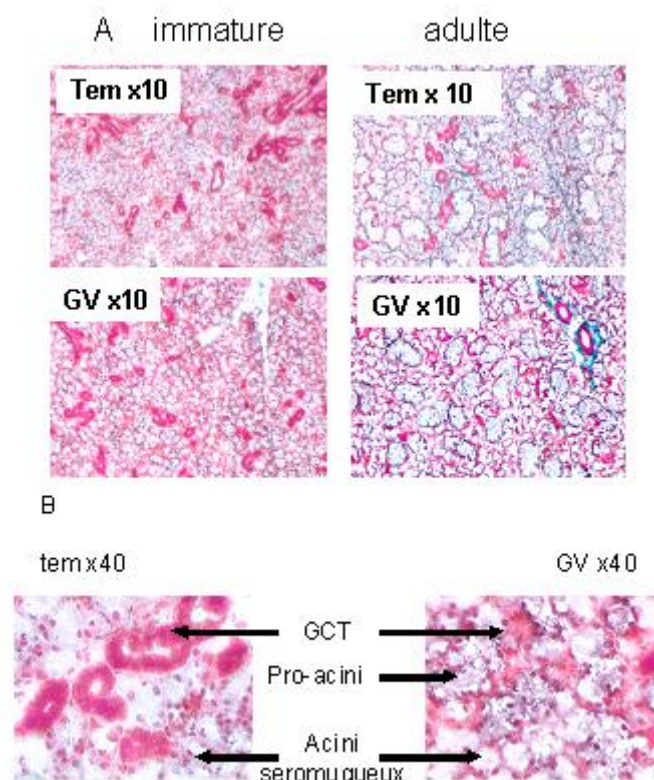
Chez les animaux immatures, les structures acinaires des glandes salivaires sont encore mal définies par rapport à celles de l'adulte. De fait, le dimorphisme sexuel est encore peu marqué, mais on note davantage d'acini muqueux chez les mâles que chez les femelles. Chez l'adulte, les acini séro-muqueux sont bien individualisés. Les différences anatomiques immature/adulte sont très visibles sur des coupes colorées au trichrome de Masson, surtout chez le mâle (**Figure 19 A**). Ces structures ont été quantifiées par analyse d'image et leur indice de prolifération a été évalué par immunodétection du Ki67, un marqueur de prolifération cellulaire (trois coupes/animal, 10 animaux/lots). Des différences selon le sexe ont été observées:

- **Chez les mâles, les différentes expositions maintiennent de manière significative ($p < 0,01$) un taux élevé des formes pro-acinaires (forme embryonnaires des acini) de type muqueux associé à un fort taux de prolifération cellulaire ($p < 0,01$) et semblent freiner la formation des acini séro-muqueux, traduisant un retard dans la maturation glandulaire, phénomène accentué chez les animaux traités par le mélange génistéine/vinclozoline (Figure 19 B).**

Ces modifications de l'anatomie microscopique traduisent donc un retard de maturation compatible avec l'effet sur la puberté précédemment décrit.

- **Chez les femelles, les formes tubulaires contournées (GCT), généralement plus abondantes que chez le mâle, étaient moins nombreuses, surtout chez les animaux traités par l'association génistéine/vinclozoline, mais elles étaient plus volumineuses, signe d'un état compensatoire. Corrélativement, l'indice de prolifération cellulaire était significativement plus faible, notamment chez les animaux traités au mélange des deux molécules ($p < 0,01$). Chez les femelles immatures (J35), le développement des structures acinaires semblait plus avancé chez les animaux traités et suggérait une évolution compatible avec une maturité glandulaire plus précoce, compatible avec un avancement de la puberté.**

Figure 19. Effets d'une exposition gestationnelle/lactationnelle à la génistéine et à la vinclozoline à faibles doses sur la glande submandibulaire chez le rat mâle immature et adulte (A) et Désorganisation des structures acinaires chez les rats traités (B).



Les modifications glandulaires observées s'accompagnaient de modifications de l'expression de divers ARNm (PCR temps réel) de gènes: marqueurs de prolifération cellulaire (KI67), récepteur à la progestérone, fortement sur exprimé chez les mâles traités par la génistéine et la vinclozoline, et à un degré moindre par le mélange, peptides salivaires (NGF et EGF, leptine). Ces effets sur l'expression des gènes ne semblent pas dépendre du mode d'exposition (gestation/ lactation vs puberté / adulte), mais semblent par contre propre aux molécules étudiées (données non présentées, publication en cours).

Note

D'autres marqueurs salivaires sont encore en cours d'étude (protéases, protéines PRP, lipocalines).

En résumé,

Pris dans leur ensemble, les résultats confirment que des perturbateurs endocriniens, ici la génistéine et/ou la vinclozoline, peuvent affecter les préférences gustatives et que ces effets ne sont pas directement associés à une modification des taux de leptine circulants. Néanmoins, l'étude in vitro, tout comme l'analyse d'expression génique dans les glandes salivaires indique que la leptine n'est peut-être pas complètement dissociée de ces mécanismes, et qu'elle est une cible des PE étudiés. Ce travail a permis d'identifier les glandes salivaires comme une cible sensible aux perturbateurs endocriniens. A l'image de ce qui est décrit pour la glande mammaire, un exposition précoce affecte leur morphogénèse tandis qu'une exposition plus tardive affecte surtout leurs fonctions (expression de gènes). Les effets sur les glandes salivaires semblent corrélés avec les effets sur les perceptions gustatives. Curieusement, l'action des molécules sur les préférences sensorielles semble davantage corrélé à l'effet observé sur les glandes salivaires, et ce quelque soit le mode d'exposition. Dans tous les cas, les effets sont majorés lors de l'exposition au mélange.

Cette partie du programme a fait (fera) l'objet des communications/publications, thèses et mémoires référencés : 11, 12, 13, 14, 19, 20, 23, 24, 26, 27, 30, 31, 33

Perspectives

Une altération des fonctions sécrétrices des glandes salivaires (EGF, NGF) pourrait possiblement entraîner des dysfonctionnements au niveau d'organes périphériques (appareil reproducteur, glande mammaire). La cible « glandes salivaires » mérite donc qu'on lui porte un intérêt particulier. D'autres investigations incluant la recherche de bio-marqueurs d'effets et l'étude conjointe des parotides sont en cours. Ces end-points seront repris dans le programme CIME (PNRPE2008) pour approfondir l'étude des effets de mélange. A ce niveau, l'étude sera élargie au Bisphénol A. Les perspectives concernent l'approfondissement des mécanismes d'action des molécules étudiées au niveau des glandes salivaires et du tissu adipeux. La stratégie d'étude sera élargie à l'observation structurale des bourgeons gustatifs et à l'exploration des effets sur le système nerveux central (thèse en cours).

E.2. Appareil reproducteur adulte et fonction de reproduction mâle (Equipe 1)

Note

Des résultats originaux de l'Equipe 1 (en collaboration avec plusieurs membres de l'Equipe 3) portant sur les anomalies de la reproduction mâle lors d'une exposition chronique à de faibles doses de génistéine et de vinclozoline de la conception à l'âge adulte (Eustache *et al.*, Andrologie 2003) à l'origine du présent programme multidisciplinaire ont incité à proposer une étude plus approfondie : 1) des facteurs « fenêtre d'exposition » (gestation/lactation vs puberté/adulte) et des mélanges à faible doses, 2) des effets observés sur l'appareil reproducteur mâle et 3) des modes d'action possibles. La participation de l'Equipe 1 au programme du PNRPE2005 prévoyait une combinaison d'approches relevant de la toxicologie de la reproduction classique et aussi des approches de biologie cellulaire plus spécifiques à la recherche des modes d'action pouvant possiblement expliquer les effets phénotypiques. Cependant, des restructurations de l'Equipe 1 survenues depuis le démarrage du programme (principalement, la réaffectation de deux membres de l'équipe à une autre équipe de recherche conduisant à leur moindre implication dans le présent programme) ont engagé à partiellement réorganiser le programme proposé : maintien de toute l'approche classique de toxicologie de la reproduction et des études fonctionnelles, et, à la recherche des modes d'action au niveau moléculaire, remplacement des approches morphométriques et immunohistochimiques (localisation/quantification des récepteurs aux hormones stéroïdes,...) par des approches « omiques », transcriptomique et protéomique en collaboration avec la plateforme protéomique de Cochin et le groupe de Daniel Vaiman à l'Institut Cochin.

Disposant de matériel conservé de la pré-étude (testicules, épидидymes, spermatozoïdes, etc...) qui en dehors du caractère continu de l'exposition avait aussi étudié des expositions à des doses supérieures, 10mg/kg/j de génistéine, 30 mg/kg/j de vinclozoline et la combinaison des deux à ces doses, nous nous sommes proposés d'étudier la faisabilité d'études omiques afin de préciser les possible effets des expositions au niveau moléculaire. L'un des objectifs escomptés de ces études à côté de tester la faisabilité des approches pour les faibles doses était de disposer de données de bases pouvant

permettre des comparaisons par la suite avec d'autres modalités d'expositions (périodes d'expositions différentes, doses différentes, etc...).

Deux études ont été réalisées :

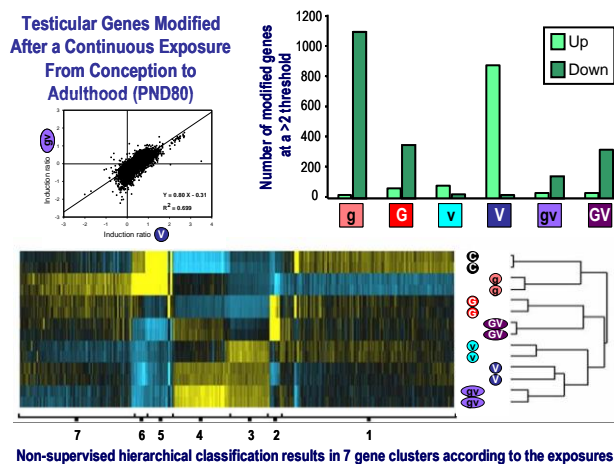
1. Effet des différentes expositions sur le transcriptome du testicule adulte,
2. Effets de l'exposition continue à la vinclozoline (30mg/kg/j) sur le protéome des spermatozoïdes épидидymaires

E.2.1. Transcriptome du testicule adulte après exposition continue à la génistéine et/ou à la vinclozoline

Ce travail présenté conjointement aux modifications phénotypiques observés chez les rats a fait l'objet d'une publication détaillée récemment parue dans Environmental Health Perspectives (Eustache *et al.*, 2009). Certains des résultats sont présentés dans la **Figure 20** et dans les **Tableaux 6 et 7**. Pour plus de détails, on se référera à cette publication.

En bref, il a été trouvé que les changements les plus significatifs chez les rats adultes - production spermatique mobilité et caractéristiques du mouvement altérées, diminution importante des tailles de portée, augmentation notable des pertes post-implantatoires - concernaient l'exposition combinée génistéine/vinclozoline aux faibles doses et l'exposition à la vinclozoline seule à 30mg/kg/j. Les profils d'expression des ARNm testiculaires pour ces expositions étaient fortement corrélés et la classification non supervisée des gènes modifiés distinguait 7 groupes de combinaisons de gènes modifiés de manière différentielles en fonctions des expositions (Figure 20). La classification fonctionnelle indiquait que plusieurs des gènes induits appartenaient à la famille des gènes impliqués dans les interactions neuroactive ligand-récepteur en liaison avec des facteurs hormonaux (par exemple FSH/FSHR, PPAR et leurs récepteurs). Toutes les modalités d'exposition diminuaient les niveaux des ARNm impliqués dans la fonction ribosomale indiquant une possible réduction globale des synthèses protéiques.

Figure 20. Modifications des gènes testiculaires induites par des expositions continues à de faibles doses de génistéine et/ou vinclozoline. Corrélation entre les gènes modifiés avec l'exposition à la dose intermédiaire de vinclozoline (30mg/kg/j) et avec l'association des faibles doses de génistéine et de vinclozoline (1mg/kg/j pour les deux (A). Nombres de gènes modifiés au dessus d'un seuil de 2 dans les différentes expositions (B). Classification hiérarchique non supervisée distinguant sept regroupement de gènes modifiés en fonction des différentes expositions et indiquant la proximité des modifications induites par l'exposition à la dose intermédiaire de vinclozoline et l'association des faibles doses de génistéine et de vinclozoline (C). g, v, faibles doses, 1mg/kg/j, G génistéine à 10mg/kg/j, V, vinclozoline à 30 mg/kg/j, et leurs associations, gv et GV.



E.2.2. Modifications du protéome des spermatozoïdes collectés dans l'épididyme de rats exposés à la vinclozoline

Les effets reproducteurs délétères, tels que les poids épидидymaires diminués, la mobilité et la vitesse des spermatozoïdes diminuées ou encore, la diminution de plusieurs indices de fertilité, pour la dose intermédiaire de vinclozoline ont encouragé à se concentrer plus spécifiquement sur des anomalies moléculaires possibles des spermatozoïdes. L'hypothèse que les anomalies observées pouvaient être, au moins en partie, le résultat d'une maturation épидидymaire altérée du fait de l'androgène-dépendance de l'épididyme avec des conséquences négatives possibles au niveau des protéines spermatiques était faite. La DIGE a été employée pour comparer le protéome des spermatozoïdes épидидymaires des animaux témoins et exposés à la vinclozoline. Toutes les protéines spermatiques solubilisées ont été prémarquées avec des cyanines (Cy3, Cy5 ou Cy2) puis séparés dans le même gel (2D PAGE). Les spots protéiques ont été scannés (Typhoon 9410) puis mesurés (ImageMaster 2d). Parmi les ~500 spots analysés, une vingtaine avaient une expression sensiblement différente dans le groupe de rats exposés par rapport aux animaux témoins offrant la possibilité d'une identification par MALDI-TOF (Figure 21).

Figure 21. Protéines modifiées identifiées par MALDI-TOF.

Spot n°	Name of identified protein	NCBI Acc. n°	Nb peptides Matched / exp.	Coverage (%)	MM Theo. / exp. (kDa)	pI Theo. / exp.
Overexpressed proteins						
5	Phosphatidylethanolamine binding protein	38649317	5 / 45	45	21 / 21	5.0 / 5.5
12	Malate dehydrogenase 2, mitochondrial precursor	38648863	8 / 56	38	36 / 38.5	8.9 / 9.1
17	Actin, cytoplasmic	1351867	8 / 55	37	42 / 48	5.2 / 5.4
18	Actin, cytoplasmic	1351867	10 / 68	41	42 / 48	5.2 / 5.4
21	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor	45737866	11 / 38	31	56 / 62	7.6 / 6.5
22	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor	45737866	11 / 38	29	56 / 62	7.6 / 6.3
35	A-kinase anchor protein 4 precursor	20271173	8 / 44	13	94 / 100	6.5 / 4.9
Underexpressed proteins						
1	Mak3	33416516	5 / 47	36	19 / 21	9.6 / 8.4
3	No identification	-	-	-	- / 21	- / 8.4
6	Unnamed protein product	12836522	4 / 62	31	21 / 26	7.0 / 9.8
8	No identification	-	-	-	- / 25.5	- / 5.6
10	Malate dehydrogenase	38648863	-	18	34 / 38.5	9.4 / 8.2
11	Malate dehydrogenase 2, NAD	19484047	5 / 60	25	36 / 38.5	8.9 / 9.1
15	Aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2	26347081	7 / 61	20	54 / 47	5.7 / 5.7
23	Similar to sestrin 3	34860334	4 / 45	11	55 / 59	5.7 / 6.3
25	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (ALDH class 2)	3121992	14 / 58	36	54 / 60	5.8 / 5.9

Plusieurs des protéines identifiées comme modifiées par l'exposition à la vinclozoline étaient des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique du spermatozoïde. D'autres protéines modifiées étaient des protéines impliquées dans la mobilité et dans la capacitation des spermatozoïdes, pouvant expliquer, au moins en partie, la diminution de la fertilité observée chez les rats exposés.

En dépit de sa nature préliminaire, il s'agit d'une des toutes premières études de protéomique dans le domaine de la toxicologie de la reproduction et des perturbateurs endocriniens. Cette étude suggérait qu'une exposition à la vinclozoline à une dose relativement faible était susceptible de diminuer la capacité fécondante des spermatozoïdes en partie au moins par une altération de plusieurs protéines structurales et fonctionnelles.

Perspectives

Dans le cadre de ce programme, des prélèvements de spermatozoïdes dans les trois régions de l'épididyme, tête, corps et queue et des prélèvements de tissu épидидymaire dans ces trois régions pour les deux fenêtres d'exposition étudiées ont été conservés dans le but de futures études protéomiques et/ou transcriptomiques.

E.2.3. Comparaison des modifications phénotypiques relatives à l'appareil reproducteur mâle après exposition à de faibles doses de génistéine et/ou de vinclozoline pendant la gestation/lactation versus la puberté/adulte versus de manière continue, de la conception à l'âge adulte

Le **Tableau 6** résume les différences phénotypiques trouvées en fonction de la nature et des périodes d'exposition.

Tableau 6. Anomalies du développement de l'appareil reproducteur et de la fertilité des rats mâles exposés à de faibles doses de génistéine et/ou de vinclozoline : Effets en fonction des périodes d'exposition, gestationnelle/lactationnelle (GL) versus puberté/adulte (PA) versus de la conception à l'âge adulte (GA). Seules les modifications significatives par rapport aux témoins sont mentionnées

Exposure window	Genistein (1mg/kg per day)			Vinclozolin (1mg/kg per day)			Genistein + Vinclozolin (1mg/kg+1mg/kg per day)		
	GL	PA	GA	GL	PA	GA	GL	PA	GA
Developmental anomalies	↗	ND	↗ (epididymal cysts)	↗	ND	↗ (epididymal cysts)	↗ (ectopic testis)	ND	↗ (epididymal cysts)
Anogenital distance					ND	↘	↘		↘
Puberty onset				↗		↗	↗		↗
Adult weight			↗						
Reproductive organ weights (in adults)	↘(only epididymis)	↘(only epididymis)		↘(only epididymis)	↘(only epididymis)		↘(only epididymis)		↘(epididymis & seminal vesicles)
Sperm production	↘				↘				↘
Sperm motility			↘			↘		↘	↘
Sperm velocity			↘		↗	↘		↗	↘
Mating index									↘
Litter size			↘						↘
Post-implantation loss	↗		↗			↗	↗		↗

C'est pour l'exposition continue de la conception à l'âge adulte et pour la combinaison des expositions à la génistéine et à la vinclozoline que le plus d'anomalies ont été observées. Les altérations de l'appareil reproducteur et de la fertilité observées chez l'adulte étaient en comparaison beaucoup plus modestes mais non nulles pour les expositions gestation/lactation et puberté/adulte. Ainsi il semblerait que lors d'une exposition à faibles doses à la génistéine et/ou à la vinclozoline, ce soit une « imprégnation » permanente affectant tous les stades du développement qui provoque le plus d'anomalies de la reproduction chez l'adulte. Dans ces conditions, les effets phénotypiques maximums sont observés pour le mélange des composés tout comme l'altération observée au niveau du transcriptome testiculaire.

De ce point de vue, il sera intéressant de comparer les données du transcriptome testiculaire dans les trois situations d'expositions (expériences en cours pour les expositions gestationnelles/lactationnelles et puberté/adulte).

Cette partie du programme a fait (fera) l'objet des communications/publications référencées : 4, 5, 6, 7, 21, 22, 23, 26, 27

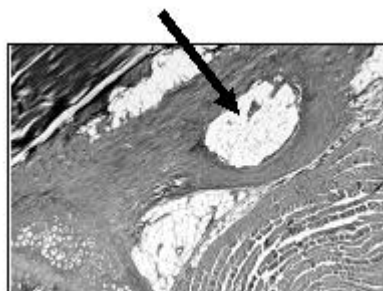
F. Effets médiés par le père exposé à de faibles doses de génistéine et/ou de vinclozoline en seconde génération non exposée: cartilage, comportement alimentaire, appareil reproducteur mâle, (Equipes 5, 3 et 1)

L'étude des éventuelles conséquences d'une exposition à faible dose à la génistéine et/ou à la vinclozoline dans la descendance de rats mâles exposés soit en gestationnel/lactationnel soit de la période prépubertaire jusqu'à l'âge adulte était l'un des objectifs de ce programme. Cette partie du travail était essentiellement exploratoire (il n'existe que de très rares travaux étudiant les conséquences transgénérationnelles d'exposition à de faibles doses de perturbateurs endocriniens à la différence des études récentes et de plus en plus nombreuses dans le cas d'expositions à des doses élevées, par exemple la série de travaux d'Anway et de son équipe avec la vinclozoline). Cet aspect de notre programme a été étudié dans les Equipes 5, 3 et 1.

F.1 Cartilage

Les rats de deuxième génération, mâles et femelles, descendant de pères exposés à la vinclozoline présentaient également des queues crénelées dans tous les cas. L'analyse histologique a révélé qu'il s'agissait de nodules occupant la même position anatomique que les nodules cartilagineux observés dans la F1 mais que ces nodules correspondaient à des amas adipocytaires (**Figure 22**).

Figure 22. Nodule (flèche) d'aspect adipogénique chez une femelle F2 à J110



L'hypothèse initiale que la vinclozoline ou la génistéine associée à la vinclozoline était directement responsable de formations ectopiques *de novo* par une action locale sur des chondrocytes du disque ou des vertèbres, est remise en question par ces observations faites en deuxième génération. Il est prévu d'examiner de manière détaillée cette question dans le programme CIME (PNRPE2008) ayant des objectifs dans la continuité du présent programme.

F.2 Comportement Alimentaire

Les préférences au sucré stimulées significativement chez l'animal immature mâle (J21) lors d'une exposition gestationnelle/lactationnelle avec chaque composé et leur association et qui n'étaient pas retrouvés à l'âge adulte, n'étaient pas non plus trouvées modifiées chez les mâles non exposés de seconde génération. *Par contre une tendance à préférer le sucré était observée sur les femelles non exposées de deuxième génération issues des pères exposés.*

Il est prévu d'examiner de manière plus détaillée la question de l'impact des expositions sur le comportement alimentaire en seconde génération non exposée dans le programme CIME (PNRPE2008).

F.3. Appareil reproducteur mâle

Des anomalies de l'appareil reproducteur mâle ont été observées en deuxième génération non exposée lorsque les pères avaient été exposés pendant la gestation et la lactation mais aussi lors d'exposition des pères de la puberté à l'âge adulte (Tableau 7). La production spermatique était significativement diminuée (pratiquement de moitié) en seconde génération pour les animaux issus de pères exposés à la vinclozoline seule ou à la vinclozoline associée à la génistéine de la puberté à l'âge

adulte alors qu'elle n'était modifiée dans aucun groupe dont le père avait été exposé en gestation/lactation (**Tableau 8**). L'étude du transcriptome testiculaire des rats de seconde génération dans les diverses modalités d'exposition est en cours.

Tableau 7. Anomalies diverses de la reproduction chez les rats mâles non exposés issus de pères exposés à de faibles doses de génistéine et/ou de vinclozoline.

Exposure	Father exposure window					
	GESTATIONAL / LACTATIONAL			PUBERTY / ADULT		
	Genistein (1 mg/kg per day)	Vinclozolin (1 mg/kg per day)	Genistein+Vinclozolin (1 mg/kg+1 mg/kg per day)	Genistein (1 mg/kg per day)	Vinclozolin (1 mg/kg per day)	Genistein+Vinclozolin (1 mg/kg+1 mg/kg per day)
Endpoints						
• Developmental Anomalies	1/20* ↗	1/21* ↗	2/21* ↗			3/20* ↗
• AGD	↗	↗	↗		↘	
• Puberty onset	↗					
• Adult weight				↘	↘	
• Reproductive organ weights in adults						
• Sperm production					↘	↘

* One or both testis ectopic or absent

Tableau 8. Effets dans la deuxième génération non exposée (F2) en fonction des périodes d'exposition des pères: Exemple de la production spermatique. (réserves épидидymaires, valeurs moyennes (écart-type) en millions de spermatozoïdes; C : témoin, g(1) : génistéine 1mg/kg/jour ; v : vinclozoline 1mg/kg/jour, gv : génistéine 1mg/kg/j + vinclozoline 1mg/kg/jour) / ANOVA sur l'ensemble des données suivi de test post hoc) ; la seconde génération lors de l'exposition continue n'a pas été étudiée

Exposure window	Exposure							
	F1: Exposed males				F2: Males stemmed of exposed fathers			
	C	g(1)	v(1)	g(1)+v(1)	C	g(1)	v(1)	g(1)+v(1)
Gestational Lactational	119(35)	111(27)	111(21)	102(24)	110(20)	123(23)	106(7)*	124(23)‡
Prepuberty Adult	117(29)**	73(32)**	80(43)*	98(44)	115(66)*	115(57)‡	54(39)*,‡	58(24)‡,§
Gestational to Adult	104(45)	106(27)	114(11)‡	58(34)‡	ND	ND	ND	ND

Overall Mean (SD): 99.4 (38.9)

ANOVA : DF 19/64 ; F=5.2 ; p<0.0001

**§E : p < 0.01

*§S : p < 0.05

+ : p < 0.10

En résumé, l'observation d'anomalies diverses en seconde génération lors d'exposition des pères à des doses faibles dans cette étude exploratoire nous a conduit à proposer une étude plus approfondie dans le programme à venir faisant suite à celui-ci.

Cette partie du programme a fait (fera) l'objet des communications/publications référencées : 8, 18

Conclusion

A notre connaissance, il s'agit d'une des premières études s'intéressant aux effets multi-tissu et multi-organe et conséquences fonctionnelles et comportementales d'expositions à de faibles doses de perturbateurs endocriniens. Comme l'indiquent les résultats présentés, en situation d'exposition alimentaire, des doses relativement faibles de génistéine et de vinclozoline - bien que non environnementales pour cette dernière - perturbent le développement, l'organisation et la fonction de plusieurs tissus et organes soumis à des régulations par les hormones stéroïdes. Certains résultats comme la formation de nodules cartilagineux ectopiques sont très inattendus, d'autres comme les effets sur les glandes salivaires et le comportement alimentaire ouvrent un nouveau et vaste champ d'investigation utile pour l'évaluation du risque pour l'homme tout comme pour la compréhension de la physiopathologie environnementale du fait des connexions entre alimentation développement et reproduction.

Les similitudes et divergences des effets produits à l'âge adulte en fonction des fenêtres d'exposition n'ont été étudiées que dans le cas de l'appareil reproducteur mâle, du cartilage, des glandes salivaires et du comportement alimentaire. Aux doses étudiées, les effets observés après une exposition gestationnelle et lactationnelle par rapport à toutes les cibles étudiées sont relativement nombreux et affectent de nombreux aspects du développement. Les conséquences d'une exposition à partir de la pré-puberté conduit à des effets tissulaires et organiques chez l'adulte relativement modestes mais non nuls. Surtout, l'exemple de l'appareil reproducteur mâle - où a été étudié le retentissement à l'âge adulte et sur la fertilité de ces deux périodes d'exposition et où a préalablement été étudié le retentissement d'une exposition continue de la conception à l'âge adulte aux mêmes doses - nous enseigne que c'est le caractère chronique de l'exposition impliquant toutes les périodes clé du développement qui provoque le maximum d'effets, notamment avec l'exposition à la combinaison des molécules (on note avec cette exposition des modifications du transcriptome testiculaire comparables à celles observées avec une exposition à une dose élevée de vinclozoline).

Les résultats en deuxième génération indiquent que quelle que soit la fenêtre d'exposition, des expositions aussi faibles de génistéine, de vinclozoline ou de leur association sont susceptibles d'induire des modifications phénotypiques médiées par le père (par exemple la réduction notable de la production de spermatozoïdes après une exposition pubertaire et adulte du père). Cet aspect de l'étude qui se voulait exploratoire mérite selon nous d'être amplifié dans de futurs programmes tenant compte des possibles implications humaines. Pour une bonne part des effets trouvés dans les différents tissus et organes, l'étude des modifications moléculaires et mécanismes d'action sous jacents est encore en cours à la fin de ce programme. Au vu des premiers résultats, les modifications « omiques » dans les organes et les possibles mécanismes d'action s'avèrent particulièrement complexes. Des tissus et organes conservés permettront là aussi des études ultérieures des modifications moléculaires et des modes d'actions. Dans ce programme les moyens alloués n'ont pas permis de mesurer les niveaux d'hormones circulantes dont la mise en perspective avec les résultats tissulaires et organiques aurait été intéressante. Cependant des sérums et plasmas sanguins ont systématiquement été conservés, permettant d'envisager ces dosages prochainement tout comme d'autres dosages qui pourraient s'avérer utiles (par exemple dans l'exploration des liens entre exposition/alimentation/reproduction et métabolisme des tissus adipocytaires).

L'ensemble des résultats de nature complexe questionne les schémas classiques de relation dose-effet linéaire qui auraient du conduire à la quasi absence d'effets compte tenu des doses utilisées. Il questionne également les modalités d'action de ces molécules le plus souvent considérées du seul point de vue de leurs propriétés oestrogénique et antiandrogénique dans des modalités expérimentales pouvant être très éloignées du modèle ici développé. La littérature indique que ces molécules ont des propriétés multiples autres que celles d'être des perturbateurs endocriniens. Les résultats et les premières données « omiques » nous confortent dans l'idée que les modifications phénotypiques observées aux doses utilisées ne font pas intervenir les seuls mécanismes impliqués dans la perturbation endocrinienne telle qu'elle est définie. Pour cet ensemble de raisons et du fait des caractéristiques du modèle utile pour l'évaluation du risque pour l'homme, les différents participants ont souhaité poursuivre et étendre le travail engagé dans de nouvelles études notamment sur les modes d'action. Ce sont les objectifs principaux du programme CIME (PNRPE2008) s'inscrivant dans la continuité du présent programme.

ANNEXE : TEXTES DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PARUES

1. R. Habert, G. Delbes, C. Duquenne, G. Livera, C. Levacher. Effets des oestrogènes sur le développement du testicule pendant la vie fœtale et néonatale. *Gynécologie, Obstétrique et Fertilité* 2006, 34: 970-977.
2. J. Merlet, C. Racine, E. Moreau, S.G. Moreno, R. Habert. Male fetal germ cells are targets for androgens which physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 3615-3620.
3. J. Merlet, E. Moreau, R. Habert, C. Racine. Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice. *Cell cycle* 2007, 6: 2258-2262.
4. F. Eustache, F. Mondon, M.C. Canivenc-Lavier, C. Lesaffre, Y. Fulla, R. Berges, J.P. Cravedi, D. Vaiman, J. Auger. Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Testis Transcriptome and Fertility. *Environmental Health Perspectives*. online, 1 avril 2009; publication prévue, Août 2009.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PREVUES

5. C.R. Cederroth, J. Auger, C. Zimmerman, F. Eustache, S. Nef. Soy, phytoestrogens and male reproductive function: a review. *Soumis à Int J Androl (Special Issue)*.
6. J. Auger, P. Maceiras, C. Lesaffre, F. Eustache, C. Broussard, P. Chafey, L. Camoin, D. Vaiman, J. Auer. Disruption of the Rat Sperm Proteome Following Chronic Exposure to Vinclozolin from Conception to Adulthood. *Soumis à Toxicology and Applied Pharmacology*.
7. F. Eustache, J. Auger, F. Mondon, M.C. Canivenc-Lavier, R. Berges, D. Vaiman. Low doses Combinations of Genistein and Vinclozolin and the Male Reproductive Tract, Testis Transcriptome and Fertility: Modulations of the Effects According to the Exposure Window, Gestation-Lactation, Puberty-Adult or Continuous, from Conception to Adulthood.
8. J. Auger, F. Eustache, F. Mondon, R. Berges, D. Vaiman, M.C. Canivenc-Lavier. Exposure to Low Doses Genistein and/or Vinclozolin during the Gestation/Lactation or Puberty/Adult Period Negatively affects the Reproductive Development and Adult Genital Tract of Unexposed Male Rats Stemmed from Exposed Fathers.
9. A. Lehraiki, S. Messiaen, R. Berges, M.C. Canivenc-Lavier, J. Auger, R. Habert, J.P. Cravedi, C. Levacher. Antagonistic effects of gestational dietary exposure to low-dose vinclozolin and genistein on fetal germ cell development.
10. A. Lehraiki, C. Chamaillard, A. Krust, R. Habert, C. Levacher. Genistein alter early testosterone production in the fetal mouse in vitro via Estrogen receptor α .

11. W. Kouidhi, M. El May, C. Desmetz, L. Decocq, R. Bergès, M.C. Canivenc-Lavier. Submandibular Salivary Glands as a New Target for Endocrine Disruptors: Evidence of Genistein and/or vinclozolin perinatal exposure effect on the submandibular properties of immature female rat offsprings.
12. W. Kouidhi, R. Bergès, C. Desmetz, L. Decocq, C. Schneider, M. El May, J. Auger, M.C. Canivenc-Lavier. Gestational/lactational exposure to dietary endocrine disruptors modifies the Submandibular salivary glands properties on immature male rat offspring.
13. R. Bergès, L. Decocq, P. Tassin, S. Issanchou, J. Auger, M.C. Canivenc-Lavier. Dietary xeno-hormone exposure during pregnancy and lactation modify sweet preference of male but not female offspring.
14. S. Boudalia, C. Belloir, M.L. Miller, R. Bergès, M.C. Canivenc-Lavier. Low dose of Genistein and vinclozolin affect blood leptin level in the rat and modify the 3T3 L1 adipocytes properties.
15. T.A. Auxière, A. Poliard, M.F. Dumontier, I. Balguy, J. Auger, M.C. Canivenc-Lavier, M.T. Corvol, J.F. Savouret. Genistein and Vinclozolin : endocrine disruptors target cartilage development, in vivo and in vitro.
16. G. Meduri, P. Phrakhonkam, H. Saad, R. Berges, M. Djallali, I. Bieche, J. Auger, M.C. Canivenc-Lavier, M. Perrot-Appanat. Mammary gland development in Wistar rats following in utero/ and lactational exposure to genistein and/or vinclozolin at human dietary level exposure.
17. J.P. Jaeg, L. Debrauwer, E. Perdu, J. Auger, J.P. Cravedi. Metabolism and disposition of vinclozolin in pregnant rats.
18. F. Eustache, J.F. Savouret, F. Mondon, R. Berges, D. Vaiman, M.C. Canivenc-Lavier, J. Auger. Exposure to Low Doses Genistein and/or Vinclozolin during the Gestation/Lactation or Puberty/Adult Period May Negatively Affect Various Developmental Features and Behavioural Traits of Unexposed Male Rats Stemmed from Exposed Fathers.

COMMUNICATIONS DANS DES CONGRES

19. R. Bergès, S. Issanchou, M.C. Canivenc-Lavier. Xeno-hormones exposure during pregnancy and lactation modify sweet preference of male but not female offspring. VIth SSIB. Paris, 2008. (publié dans : *Appetite* 51 p 353, 2008)
20. W. Khoudi, R. Bergès, C. Desmetz, L. Decocq, M. El May, J. Auger, M.C. Canivenc-Lavier. Genistein and/or vinclozolin neonatal exposures modify the submandibular nipple properties of male and female offsprings. 5th International Meeting in Advances in Antioxidants (Trace Elements, Vitamins and Polyphenols). Monastir-Sousse, Tunisie, 2008.
21. F. Eustache, F. Mondon, M.C. Canivenc-Lavier, C. Lesaffre, Y. Fulla, R. Berges, J.P. Cravedi, D. Vaiman, J. Auger. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of

- genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome and fertility. 5th Workshop on Endocrine Disruptors. Copenhagen, Denmark, 2009.
22. J. Auger, P. Maceiras, C. Lesaffre, F. Eustache, C. Broussard, P. Chafey, L. Camoin, D. Vaiman, J. Auer. A subchronic exposure - from conception to adulthood - to the antiandrogen vinclozolin disrupts the sperm proteome in the Rat. 5th Workshop on Endocrine Disruptors. Copenhagen, Denmark, 2009.
23. J. Auger, F. Eustache, C. Levacher, M. Applanat, R. Berges, J.P Cravedi, R. Habert, J.F. Savouret, D. Vaiman and M.C. Canivenc-Lavier. Gestational/lactational vs puberty/adult exposures to dietary genistein and/or vinclozolin in rodents: effects on several organs and tissues at different developmental stages. 5th Workshop on Endocrine Disruptors. Copenhagen, Denmark, 2009.
24. W. Kouidhi, R. Bergès, C. Desmetz, M. El May, J. Auger and M.C. Canivenc-Lavier. Submandibular salivary glands as a new target for endocrine disruptors: effect of genistein and/or vinclozolin neonatal exposures on male and female offspring. 5th Workshop on Endocrine Disruptors. Copenhagen, Denmark, 2009.
25. J. Bursztyka, L. Debrauwer, J.P. Jaeg, E. Perdu, J.P. Cravedi. Etude du métabolisme de la vinchlozoline in vitro et in vivo chez le rat. Poster aux 24èmes journées françaises de spectrométrie de masse, Pau, 2007.
26. J. Auger, F. Eustache, R. Berges, C. Levacher, M. Applanat, J.F. Savouret, J.P. Cravedi, R. Habert, D. Vaiman, M.C. Canivenc-Lavier. Gestational/Lactational vs Puberty/Adult Exposures to Dietary Genistein and/or Vinclozolin in Rodents: Effects on Several Organs and Tissues. Colloque PNRPE. Angers, 2008.
27. J. Auger, F. Eustache, R. Berges, C. Levacher, M. Applanat, J.F. Savouret, J.P. Cravedi, R. Habert, D. Vaiman, M.C. Canivenc-Lavier. Expositions gestation/lactation vs puberté/adulte à la génistéine et/ou la vinclozoline chez les rongeurs: Effets sur différents organes et tissus. Colloque MEDD, Environnement chimique, reproduction et développement de l'enfant. Paris, 2008.
28. M. Applanat. Modèles expérimentaux et tumorigénèse mammaire. Colloque Pesticides et Cancer, Canceropole, Paris, 2008.
29. J.F. Savouret. Vinclozolin, a pesticide with cartilage impact. Réunion annuelle du groupe du disque intervertébral. Orléans, 2008.

THESES ET MASTERS

30. O. Jemay, 2006. Action de xeno-oestrogènes sur le développement des glandes salivaires : impact d'une exposition en composés oestrogéniques alimentaires. Master II Sciences des Aliments Université de Bourgogne, Dijon. (responsable scientifique: M.C. Canivenc-Lavier)
31. P. Phrakhonkam, 2007. Actions différentielles de xéno-hormones alimentaires sur les organes reproducteurs, le foie et le tissu adipeux chez le rat femelle: aspects endocriniens, métaboliques et morphogénétiques en relation avec les processus de

cancérogène » Doctorat de l'Université de Bourgogne, Dijon (Directeur, M.C. Canivenc-Lavier)

32. M. Djallali, 2008. Mémoire de Master 2 de Reproduction, Université Paris7 (Directeur, M. Perrot-Appianat)
33. S. Boudalia, 2009. Effets de xéno-hormones sur la leptinémie chez le rat et sur la différenciation et les fonctions endocrines des adipocytes 3T3-L1 associées au comportement alimentaire. Master 2 Recherche Qualité des aliments Option Sensorialité et comportement, Université de Bourgogne, Dijon (responsable scientifique: M.C. Canivenc-Lavier)

ANNEXE : PARTIE CONFIDENTIELLE

Vous pouvez insérer ici toute information ou résultat qui revêt une part de confidentialité.

Merci de préciser le degré de confidentialité de ces données.

Nous vous recommandons de préciser dans la partie non confidentielle l'existence de ces données confidentielle et d'expliquer la raison de leur confidentialité.

Cette partie ne sera pas diffusée sur le site Internet du Ministère.

Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).

Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.

Une grande partie des résultats originaux présentés dans ce rapport n'est pas encore publiée, les manuscrits étant en cours d'écriture.

Les différentes équipes émettent donc le souhait que leurs données ne soient rendues publiques, notamment sur Internet, si possible qu'à compter du début de l'année 2010 ce qui laisse ainsi le temps de finir de soumettre les publications dans des journaux scientifiques.